



**BENEMÉRITA
UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



Instituto de Ciencias

Centro de investigación en ciencias microbiológicas

Laboratorio de interacción bacteria-planta

Tesis:

Rol del gen *cheY-L* de *Azospirillum baldaniorum* en movilidad y formación de biopelícula.

Presenta:

LBT. Vania Lizandre Castañón Vargas

Para obtener el título de

Maestra en ciencias microbiológicas

Directora de tesis:

Dra. Beatriz Eugenia Baca

Puebla, Puebla

Noviembre del 2023



BUAP

Puebla, Pue. a 27 de noviembre 2023.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**


Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Vania Lizandré Castañón Vargas**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Rol del gen cheY-L de *Azospirillum baldaniorum*, en movilidad y formación de biopelícula"


A nuestro juicio, la alumna **Vania Lizandré Castañón Vargas** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"


D.C. Sandra Raquel Reyes Carmona


D.C. Alberto Ramírez Mata


D.C. Candelario Vázquez Cruz


D.C. Lucía Soto Urzúa

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

TABLA DE CONTENIDO

Tabla de contenido	3
Agradecimientos.....	5
Dedicatoria	6
A. Tabla de abreviaturas.....	7
B. Resumen.....	8
1. Introducción.....	9
1.1 Importancia agrícola.....	9
1.2 Modelo de estudio	9
1.2.1 Interacción bacteria-planta	10
1.3 Sistemas de doble componente.....	13
1.3.1 Sistemas de doble componente en <i>Azospirillum</i>	14
3. Antecedentes específicos.....	16
4. Objetivos.....	20
4.1 Objetivo general.....	20
4.2 Objetivos particulares.....	20
5. Hipótesis	20
6. Esquema de trabajo	21
7. Materiales y métodos.....	22
7.1 Material biológico.....	22
7.1.1 Cepas	22
7.1.2 Vectores.....	22
7.1.3 Oligonucleótidos.....	23
7.2 Metodología	23
7.2.1 Diseño de iniciadores del ORF de <i>cheY-L</i>	23
7.2.2 Análisis de secuencias	23
7.2.3 Cultivos celulares	24
7.2.4 Extracción de ADN.....	24
7.2.5 Clonación por ligación de <i>cheY-L</i> en pGEM-T Easy.....	24
7.2.6 Transformación de <i>E. coli</i>	25
7.3 Subclonación de <i>cheY-L</i> de pGEM-T Easy a pJB3Tc20.....	25
7.4 Conjugaciones	25

7.5	Cuantificación de biopelícula	25
7.6	Movilidad.....	25
7.7	Análisis estadísticos.....	26
8.	Resultados	27
8.1	Diseño de oligonucleótidos.....	27
8.2	Clonación de <i>cheY-L</i> en pGEM-Teasy.....	28
8.3	Secuenciación de la construcción pGEM <i>cheY-L</i>	29
8.4	Subclonación en el vector pJB3Tc20 para obtener la construcción pJ <i>cheY-L</i>	30
8.5	Secuenciación del plásmido pJ <i>cheY-L</i>	31
8.6	Comprobación de las clonas seleccionadas de <i>A. baldaniorum</i> con la construcción pJ <i>cheY-L</i>	32
8.7	Curvas de crecimiento	33
8.8	Biopelícula	34
8.9	Movilidad.....	36
8.9.1	Movilidad hacia malato	36
8.9.2	Movilidad hacia lactato.	38
8.9.3	Movilidad hacia prolina	40
9.	Discusión.....	42
10.	Conclusiones	45
11.	Perspectivas	46
12.	Bibliografía.....	47
13.	Anexos	50
13.1	Medios de cultivo.....	50
13.2	Técnica de extracción de ADN adaptada para <i>A. baldaniorum</i> Sp245.....	52
13.3	Protocolos de PCR	53

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a CONACYT por su financiamiento, el cual ha hecho posible la realización de esta investigación. Su apoyo ha sido fundamental para el desarrollo de mi proyecto de tesis y ha contribuido significativamente a mi formación académica.

Asimismo, quiero extender mi gratitud a los distinguidos docentes que forman parte del laboratorio de interacción bacteria-planta: la Dra. Baca, la QFB. Mary, la Dra. Sandra y el Dr. Alberto. Su guía experta, paciencia y enseñanzas han sido fundamentales en cada etapa de esta investigación. Su compromiso con la excelencia académica ha sido una inspiración y un motor para mi desarrollo en el campo científico.

Además, agradezco sinceramente a los profesores que me han impartido clases a lo largo de mi trayectoria académica. Sus lecciones y enseñanzas han ampliado mi perspectiva y han contribuido de manera invaluable a mi formación profesional. Su dedicación a la educación ha dejado una huella duradera en mi camino académico.

DEDICATORIA

A quienes han sido pilares invaluables en este viaje académico:

- A Chargaff, quien, con su presencia atenta y serena, se convirtió en una compañía invaluable durante cada momento de las clases en línea.
- A Linux, cuya memoria sigue iluminando mis días. Su alegría era mi fuente de motivación al regresar del laboratorio.
- A mi hermana, por ser la luz constante en mi vida. Tu apoyo incondicional y tu habilidad para hacerme sonreír han sido un pilar importante.
- A Beny, por estar a mi lado en cada paso de este camino. Tu apoyo, ánimo y presencia constante han sido mi fortaleza y parte de la base de mi perseverancia.
- A mi familia, por alentar mis estudios y respaldar cada una de mis decisiones. Este logro también es suyo.
- A Erik y Toño, quienes continúan siendo presencias significativas en mi vida. Su constante apoyo y amistad han sido pilares inquebrantables.
- A todas y todos mis compañeros de laboratorio. Gracias por convertir el laboratorio en un espacio de camaradería y aprendizaje. Sus aportes en los experimentos, las conversaciones interminables y los debates a la hora de comer han hecho de esta experiencia algo inolvidable.

A. TABLA DE ABREVIATURAS

SDC	Sistema de doble componente
HQ	Histidina quinasa
RR	Regulador de respuesta
°C	Grados centígrados
SOB	Super optimal broth
Pb	Pares de bases
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
NHI	National Institutes of Health
MPM	Marcador de peso molecular

B. RESUMEN

El nitrógeno, fósforo y potasio son utilizados ampliamente como fertilizantes químicos en la producción agrícola actual. Sin embargo, los fertilizantes de nitrógeno, en particular, se consideran la principal fuente de contaminación del agua en este contexto. Una alternativa para reducir la dependencia de agroquímicos, son los biofertilizantes, formulaciones de microorganismos que al ser inoculados en semillas, plantas o suelo promueven el crecimiento vegetal.

El género *Azospirillum* destaca por su capacidad para estimular el crecimiento vegetal mediante la fijación de nitrógeno y la producción de fitohormonas. Su habilidad para colonizar las raíces vegetales se logra a través de quimiotaxis, un movimiento hacia entornos favorables y en respuesta a gradientes químicos. Este proceso se lleva a cabo a través de sistemas de doble componente (SDC), constituidos por una histidina quinasa (HQ) y un regulador de respuesta (RR).

CheY-L, un RR de dominio único, fue objeto de estudio en el 2021 por Cardona, quien generó una mutante de *Azospirillum baldaniorum*, eliminando el gen *cheY*. Además, se caracterizó la estructura secundaria típica de CheY-L a comparación de otras proteínas CheY: 5 α hélices y 5 β plegadas. Se identificó el aminoácido aspartato, clave para la recepción del grupo fosfato en el final de la tercer β plegada. La conservación de los aminoácidos responsables de la fosforilación de la proteína CheY de *E. coli* se encuentran también altamente conservados en la proteína CheY-L.

En este proyecto de investigación se llevó a cabo la complementación de *A. baldaniorum* $\Delta cheY$ -L y la construcción de la mutante sobreexpresada *A. baldaniorum* pJcheY-L, junto con los controles respectivos con el plásmido pJB3Tc20. Se observó un crecimiento disminuido en las mutantes con el plásmido pJB3Tc20 o pJcheY, sugiriendo que el plásmido pJB3Tc20 podría estar imponiendo una carga en el metabolismo de *A. baldaniorum*, afectando su desarrollo normal.

La producción de biopelículas no mostró diferencias estadísticamente significativas entre la mutante y la cepa silvestre, ni entre la mutante complementada pJcheY y la mutante control con el plásmido pJB3Tc20. Tampoco se evidenció diferencia estadísticamente significativa en la movilidad de la mutante $\Delta cheY$ y la cepa silvestre en presencia de los quimioattractantes malato, lactato y prolina. Estos resultados sugieren que *cheY*-L no desempeña un papel imprescindible en la movilidad de *A. baldaniorum* Sp245 bajo las condiciones evaluadas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 IMPORTANCIA AGRÍCOLA.

El nitrógeno, fósforo y potasio son utilizados ampliamente como fertilizantes químicos en la producción agrícola actual. Su importancia es tan significativa, que se estima que la mitad de los cultivos mundiales dependen de estos fertilizantes para su crecimiento óptimo, no obstante, la utilización persistente de estos productos ha tenido consecuencias negativas notables. Uno de los efectos adversos más importantes es el deterioro del suelo, que se manifiesta en la reducción de su pH y en el incremento de la acumulación de metales pesados, por ejemplo, el cadmio, plomo, arsénico y cromo se encuentran presentes en los fertilizantes (Srivastav, 2020). Sumado a esto, se calcula que del fertilizante total aplicado a los cultivos únicamente entre el 10 y 40% es aprovechado por las plantas (Raffi & Charyulu, 2020).

Además, esta práctica agrícola contamina el agua superficial y subterránea. Los fertilizantes de nitrógeno son considerados la principal causa de contaminación de agua en este contexto. Cuando se aplican, pueden transformarse en nitratos y nitritos, compuestos más solubles en agua que sus precursores. La presencia de nitratos y nitritos en el agua reduce los niveles de oxígeno, lo que tiene efectos perjudiciales en organismos acuáticos. En los humanos, la detección de estos compuestos en el agua de consumo se ha asociado con enfermedades como la metahemoglobinemia en infantes y cáncer de estómago en adultos (Srivastav, 2020).

Ante esta problemática, una de las alternativas viables para reducir la dependencia de agroquímicos son los biofertilizantes, formulaciones de microorganismos que cuando se inoculan en semillas, plantas o suelo, se establecen en la rizosfera o endofíticamente y promueven el crecimiento de las plantas huésped (Raffi & Charyulu, 2020). Existen tres grupos de microorganismos considerados biofertilizantes: las bacterias promotoras del crecimiento (PGPB, por su acrónimo del inglés), los hongos micorrícicos arbusculares y los rizobios fijadores de nitrógeno. Estos microorganismos desempeñan funciones altamente beneficiosas para el suelo y la agricultura en general. Entre las actividades benéficas que se realizan se incluyen: mejora de la disponibilidad de fitonutrientes, mejora de la estructura del suelo, descomposición de sustancias tóxicas, producción de hormonas promotoras del crecimiento vegetal y promoción del incremento de la tolerancia al estrés biótico y abiótico por parte de la planta (Pedraza et al., 2020).

Las PGPB han sido ampliamente estudiadas debido a su efectividad en la promoción del crecimiento de diferentes plantas de interés agronómico. Uno de los mecanismos detrás de esta actividad es la fijación biológica de nitrógeno, que reduce el N₂ que se encuentra en la atmósfera a amoníaco. El nitrógeno obtenido de esta forma es menos susceptible a la lixiviación, desnitrificación o volatilización, por lo que se considera un proceso biológico que contribuye a la sustentabilidad en prácticas agronómicas (de Souza et al., 2015).

1.2 MODELO DE ESTUDIO

El género *Azospirillum* ha sido ampliamente caracterizado por sus beneficios en la agricultura, cuenta con 27 especies y se encuentra distribuida en zonas que van desde los tropicales, subtropicales y regiones templadas, son organismos de vida libre pero también son capaces de colonizar una amplia variedad de

plantas, desde cereales, caña de azúcar, pastos, plantas de café, frutales, florales e incluso orquídeas. (Pedraza et al., 2020).

Pertenciente al filo alphaproteobacteria, el género *Azospirillum* se caracteriza por una morfología de bacilos Gram negativos, ligeramente curvos, no forman esporas, pero sí pueden formar quistes en los que se presentan granos de polihidroxibutirato. Poseen un flagelo polar único y múltiples peritricos. Son microaerobios, no fermentativos y quimioorganótrofos (Pedraza et al., 2020).

Este género fue descrito por primera vez en 1925 como *Spirillum lipoferum*, por Beijerinck, más tarde, en 1974 Dobereiner y Day la aislaron de raíces de pastos en Brasil y la reportaron como fijadora de nitrógeno. En 1978, Tarrand propuso la creación del género *Azospirillum* al distinguir dos especies: *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum* (Raffi & Charyulu, 2020).

La mayoría de las especies de *Azospirillum* son conocidas por sus interacciones benéficas con plantas, son capaces de promover el crecimiento vegetal debido a varios mecanismos: fijación de nitrógeno y producción de fitohormonas (auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno, ácido salicílico), vitaminas (niacina, tiamina y ácido pantoténico) y sideróforos. También promueve la producción de hormonas, antioxidantes y el ajuste osmótico, que permite a la planta sobrellevar de mejor manera condiciones estresantes de salinidad u ósmosis. Otra característica de este género es el biocontrol de microorganismos patógenos para la planta mediante producción de sustancias antimicrobianas y antifúngicas, aunque esta facultad no es un rasgo principal del género (Pedraza et al., 2020) (Raffi & Charyulu, 2020).

A. baldaniorum Sp. 245, una de las especies más investigadas del género *Azospirillum*, fue reclasificada con este nombre, siendo anteriormente denominada como *A. brasilense* Sp. 245. Esta modificación se basó en análisis de secuencias 16s rRNA, genes *housekeeping*, índice de relación del genoma y de filogenia del proteoma central, los cuales revelaron a esta especie como una distinta de *A. brasilense* Sp. 7. La identidad promedio de las secuencias nucleotídicas entre estas especies es de menos del 95- 96%, el límite para la delimitación entre especies.

El nombre de la especie "baldaniorum" se acuñó en honor al Dr. José Ivo Baldani y la Dra. Vera Divan Baldani, microbiólogos brasileños pioneros en la investigación del género.

A. baldaniorum Sp245 fue aislada inicialmente de la superficie de raíces de trigo (*Triticum aestivum* L.) en el estado de Rio grande do Sul, al sur de Brasil. Una de sus características distintivas es su capacidad de colonizar las raíces de trigo endofíticamente, a diferencia de *A. brasilense*. Asimismo, estas dos especies presentan diferencias en cuanto a las fuentes de carbono que pueden utilizar para su crecimiento. *A. baldaniorum* Sp245 crece bajo una gama más amplia de fuentes de carbono a comparación de *A. brasilense* Sp7, estas incluyen D-arabinol, D-fructosa, L-fucosa, D-galactosa, entre otras. Además, *A. baldaniorum* Sp245 exhibe la capacidad de reducir nitratos y nitritos, así como producir indoles, β -glucosidasa y β -galactosidasa. (Ferreira et al., 2020).

1.2.1 Interacción bacteria-planta

1.2.1.1 Unión a raíces vegetales

La interacción de las especies de *Azospirillum* y las diferentes plantas que es capaz de colonizar, está dada por la unión a las raíces. En la **Figura 1** se muestra el proceso de colonización por parte de *Azospirillum*, en el primer paso, bacterias realizan quimiotaxis hacia exudados liberados por la raíz, estos pueden estar compuestos por aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares y compuestos aromáticos.

Posteriormente, sucede la unión, que permite una asociación activa entre ambos organismos. Este proceso está dividido en dos fases sucesivas: la adsorción (3) y el anclaje (4). La adsorción representa una unión débil entre la bacteria y las células de la raíz, se encuentra mediada por la glicosilación de la flagelina en el flagelo y por los polisacáridos capsulares bacterianos que se adhieren a la superficie radicular. Un ejemplo de estos, son las lectinas, proteínas de unión a azúcares que se unen a los carbohidratos presentes en la superficie de raíz de las plantas. El anclaje es la unión irreversible entre *Azospirillum* y la planta. Este proceso está mediado por exopolisacáridos, que pueden estar unidos débilmente a la membrana externa bacteriana o ser directamente expulsados al medio extracelular. Después del anclaje, bacterias aledañas al sitio de unión realizan swarming, un proceso en el que grupos bacterianos avanzan rápidamente en superficies, lo que les permite colonizar de una forma coordinada. Finalmente ocurre la formación de microcolonias, lo que conlleva a la formación de biopelícula (Rodrigues et al., 2015).

1.2.1.2 Colonización de la endoriza

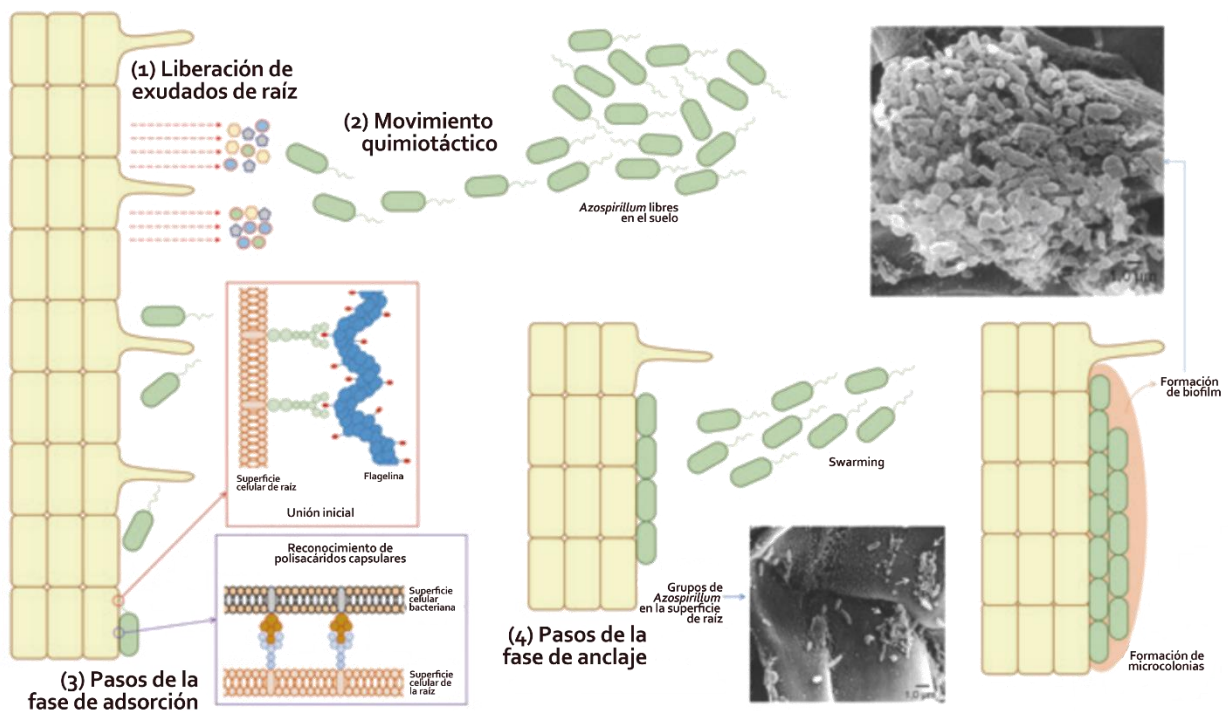


Figura 1. Pasos de la unión de *Azospirillum* a raíces de planta. Tomado de (Rodrigues et al, 2015) Y traducido

Azospirillum baldaniorum Sp245 es una especie capaz de colonizar la endoriza una vez que ha logrado la colonización de la superficie radicular. Las bacterias endofíticas pueden ingresar a la raíz cuando la capa celular externa se disrumpe, por ejemplo, cuando crecen raíces secundarias o cuando las bacterias patógenas crean aberturas. Una vez que pasan la barrera de la endodermis, las bacterias endófitas penetran el periciclo que les permite llegar al sistema de xilema y floema (**Figura 2**) (Compant et al., 2010).

1.2.1.3 Formación de biopelícula

Las biopelículas son estructuras organizadas que permiten a las bacterias unirse a diversas superficies tanto bióticas como abióticas permitiendo así una transición de su estado móvil a sésil. En el caso de *Azospirillum*, estas biopelículas son fundamentales para establecer relaciones simbióticas con la planta y ejercer un impacto positivo en su desarrollo. La composición de la biopelícula incluye una matriz polimérica hidratada constituida por proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos. La biopelícula proporciona a las bacterias un nicho que les otorga protección contra agentes tóxicos, así como

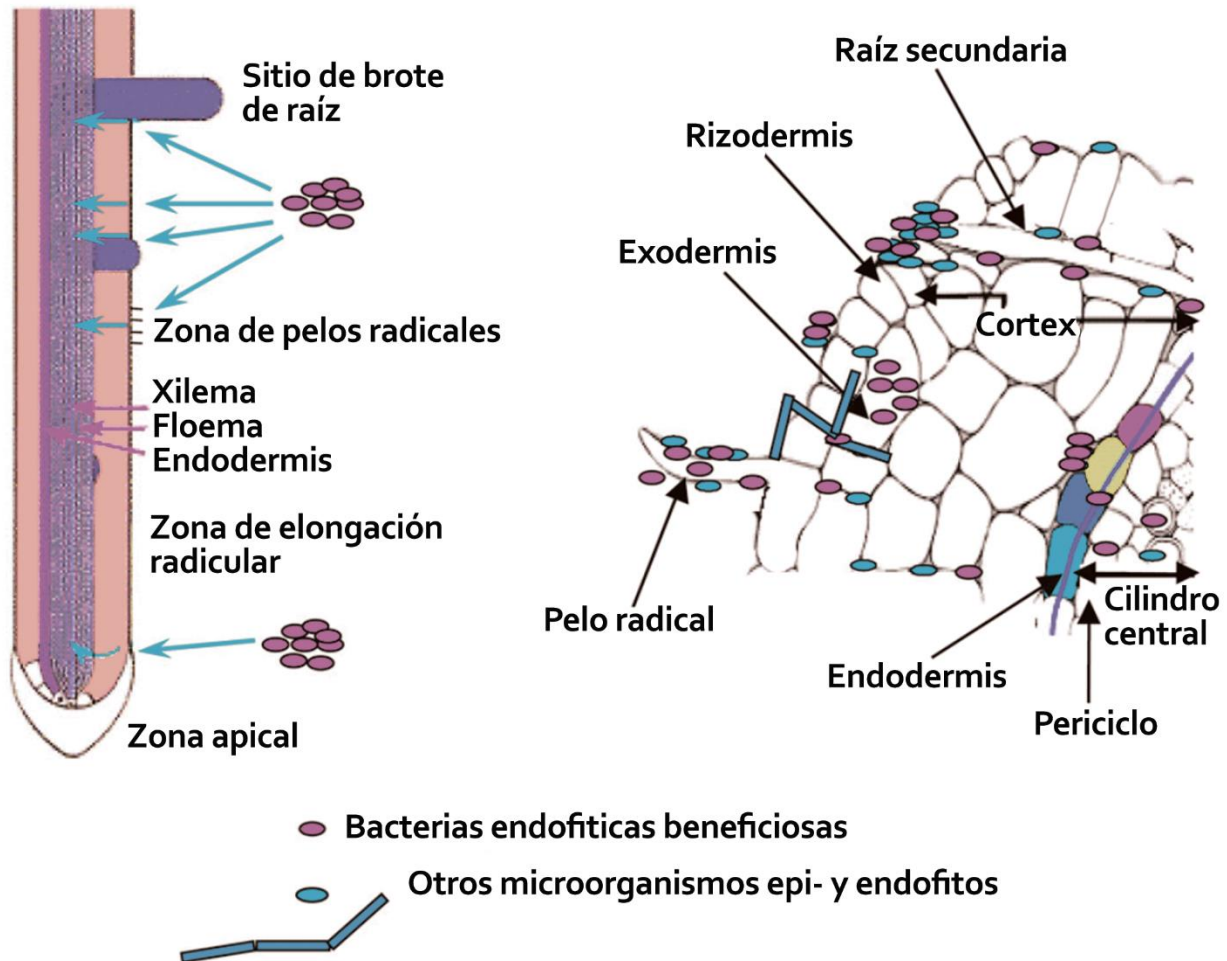


Figura 2. Sitios de colonización en raíces vegetales. Tomado de (Compant et al. 2010) y traducido

adaptación a condiciones de nutrientes limitados y a fluctuaciones en los niveles de oxígeno y osmolaridad, además de proporcionar estabilidad mecánica. (Dario Cassán et al., 2015; Pedraza et al., 2020).

El ácido di- (3'-5') guanosín-monofosfato cíclico (di-GMPc) es un segundo mensajero con un papel crucial en la regulación de la formación de biopelículas ya que interviene en la expresión de genes que codifican EPS, adhesinas y proteínas de membrana, componentes de la matriz extracelular (Ramírez-Mata et al., 2014). Los niveles intracelulares de di-GMPc están sujetos a una relación antagonista por diguanilato ciclasas (DGC) y fosfodiesterasas (PDE), que sintetizan e hidrolizan di-GMPc, respectivamente. El aumento en los niveles celulares de di-GMPc se correlaciona con una mayor producción de

exopolisacáridos, lo que a su vez favorece la transición de la bacteria al estado sésil. En *A. baldaniorum* Sp245 se ha investigado el papel de las diguanilato ciclasas, como es el caso de CdgC, la cual desempeña una función crucial en la formación de biopelículas óptimas al contribuir a la producción de exopolisacáridos, además de estar implicada en la internalización de *A. baldaniorum* Sp245 en las raíces de trigo (Sierra Cacho et al., 2021). Asimismo, la DGC CdgD también está asociada con la producción de exopolisacáridos y componentes de la biopelícula, así como también en la movilidad bacteriana (Cruz-Pérez et al., 2021).

1.3 SISTEMAS DE DOBLE COMPONENTE

La quimiotaxis es el movimiento hacia un ambiente favorable y en concordancia con gradientes químicos, este proceso permite a las bacterias móviles la capacidad de monitorear cambios en las condiciones ambientales mientras se desplazan. Los nutrientes comunes, como azúcares o aminoácidos, son quimioatrayentes, mientras que condiciones como pH extremos o la presencia de altos niveles de compuestos tóxicos las repelen. El sistema quimiotáctico modula la duración de los lapsos de movimiento de acuerdo a los cambios del medio ambiente percibidos (Colin et al., 2021).

La quimiotaxis se lleva a cabo a través de sistemas de señalización, típicamente constituidos por dos elementos, la histidina quinasa y el regulador de respuesta, lo que les otorga el nombre de sistemas de doble componente (SDC) (Figura 3). Estos sistemas se encuentran en bacterias, arqueas y también en eucariotas como plantas y levaduras.

La actividad de los SDC comienza con la detección de un estímulo medioambiental por parte del dominio sensorial extracelular de la histidina quinasa (HQ). Esta molécula es un homodímero también conocida como sensor quinasa. Posteriormente, la transducción de la señal ocurre a través de la fosforilación dependiente de ATP del residuo His de la HQ, este residuo se encuentra en el dominio dimérico DHp (*dimerical histidine phosphotransfer domain*). El dominio CA (*catalytic ATP binder*) une el ATP necesario para fosforilar el residuo de His. (Casino et al., 2010; Agrawal et al., 2016).

El grupo fosforilo es transferido a un residuo de Asp expuesto en el dominio receptor REC (*receiver*

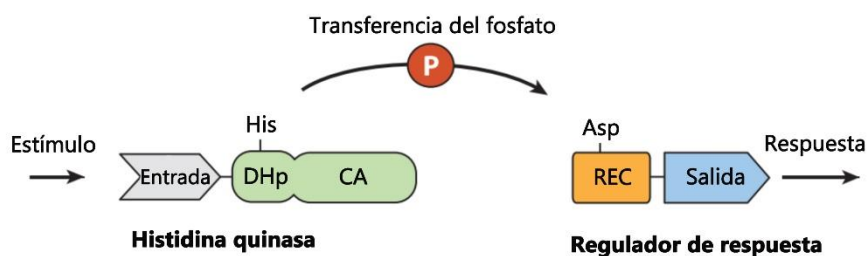


Figura 3. Mecanismo general de los SDC. Tomado de (Gao et al., 2019) y traducido

domain) del regulador de respuesta (RR), que cambia su conformación, generalmente modelando la afinidad del dominio efector y generando la respuesta correspondiente al estímulo. Cuando el dominio efector no existe, el dominio REC toma también el papel del dominio efector (Casino et al., 2010).

El dominio REC del RR es una estructura conservada y compuesta de 5 α -hélices que circundan 5 hojas β plegadas. Aproximadamente un 23% de RRs están compuestos exclusivamente por un dominio REC y las identidades entre las secuencias REC de diferentes RR tienen rangos de 20-30%.

Las subfamilias de RRs están definidas por los dominios efectores identificados en la herramienta bioinformática Pfam, que ubica a las proteínas en familias. Las proteínas representativas tradicionalmente nombran a las subfamilias OmpR, NarL y NtrC. Esto es ilustrado en la **Figura 4**, donde las estructuras representativas de cada clase de subfamilia se presentan con los dominios del receptor REC mostrados en gris y los dominios efectores a color (Gao et al., 2019).

Uno de los SDC para la quimiotaxis en *E. coli*, está compuesto por CheA (como HQ) y CheY (como RR). Cuando CheA se activa dona un grupo fosfato a CheY, que en la forma de CheY-P induce la rotación del flagelo, en sentido de las manecillas del reloj. En tanto que CheZ desfosforila a CheY-P (Bi & Sourjik, 2018). En *Shewanella oneidensis*, CheA₃ fosforila a CheY₃, posteriormente ésta se une al rotor del flagelo y modifica la dirección de nado, similar a lo que sucede *E. coli*, sin embargo, se ha descubierto que CheY₃-P tiene un papel importante durante la generación de biopelículas asociadas a superficie. En este mecanismo, la fosforilación de CheY₃-P no depende de CheA₃, sin embargo, puede limitar el grosor de la película. Para el desarrollo de la biopelícula, CheY₃-P interacciona con dos diguanilato ciclasas (enzimas que sintetizan di-GMP-c, necesario para cambiar del estado móvil al sésil), PdgA y PdgB. Un punto importante de este estudio es que CheY ortólogos son capaces de suprimir defectos en la formación de biopelícula de especies mutantes en *cheY₃*, lo que podría sugerir un rol dual en otras

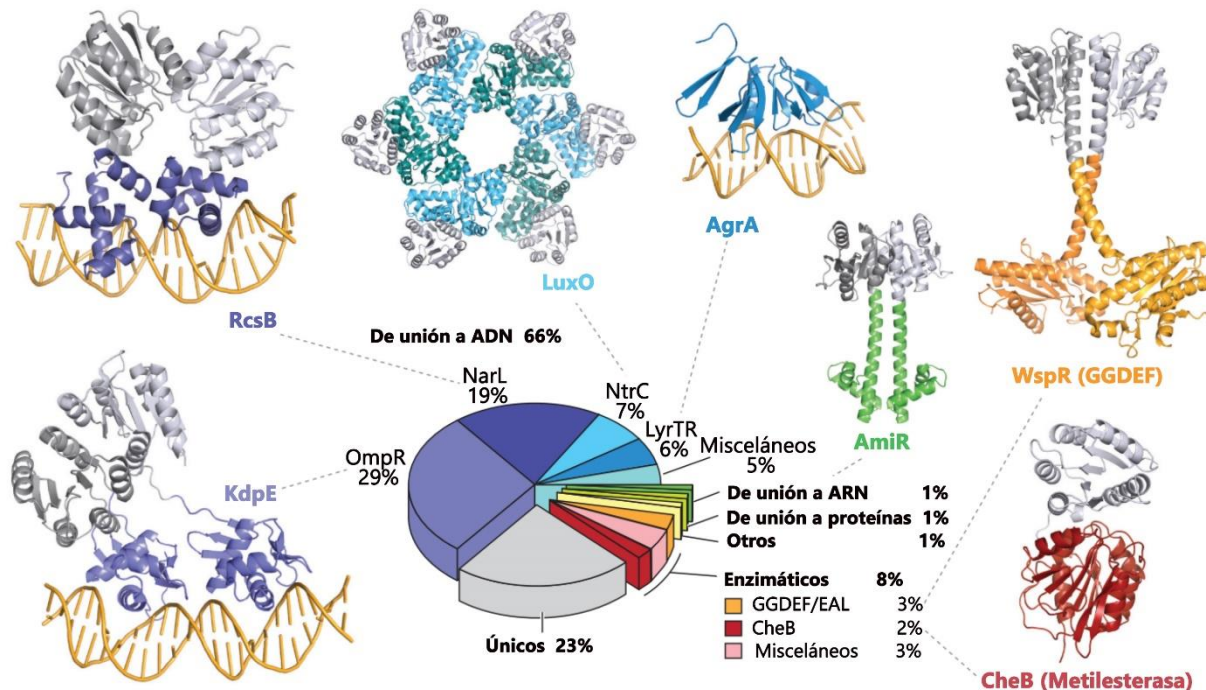


Figura 4. Clasificación de subfamilias de RR por sus dominios efectores. Tomado de (Gao et al., 2019) y traducido.

especies (Boyeldieu et al., 2020).

1.3.1 Sistemas de doble componente en *Azospirillum*

Los SCD han sido estudiados en especies filogenéticamente cercanas a *A. baldaniorum* Sp245, por ejemplo, en *Azospirillum brasilense* Sp7, la cual tiene dos vías para quimiotaxis distintas, nombradas Che1 y Che4 (Figura 5). La HQ CheA1 y su RR CheY1 regulan cambios en la velocidad de nado durante la quimiotaxis, mientras que la HQ CheA4 y su RR CheY4 controlan la probabilidad de cambios en la

dirección de nado o reversiones durante la quimiotaxis. Los RR CheY6 y CheY7 se encuentran codificados fuera de los clusters *che1* y *che4*. Las mutantes que carecen de *cheA4*, *cheY4* o *cheY7* no son capaces de realizar quimiotaxis, mientras que las que no poseen *cheY1* o *cheY6* pueden realizarla aún (Mukherjee et al., 2016) (Ganusova et al., 2021).

En *A. brasilense* Sp7, los receptores de membrana unidos a quimiotaxis (Tlps, *Transduction like proteins*, acrónimo del inglés) reciben señales del exterior que cambian su conformación, mientras que CheA1 y/o CheA4 se autofosforilan, repercutiendo en la fosforilación de las CheYs. La actividad de los Tlps se enciende mediante la adición de grupos metilo por parte de las metiltransferasas CheR1 y CheR4 y se apaga cuando las metilesterasas CheB1 y CheB4 remueven estos grupos. La actividad de CheB1 y CheB4 depende de la autofosforilación de CheA1 y CheA4 (Ganusova et al., 2021).

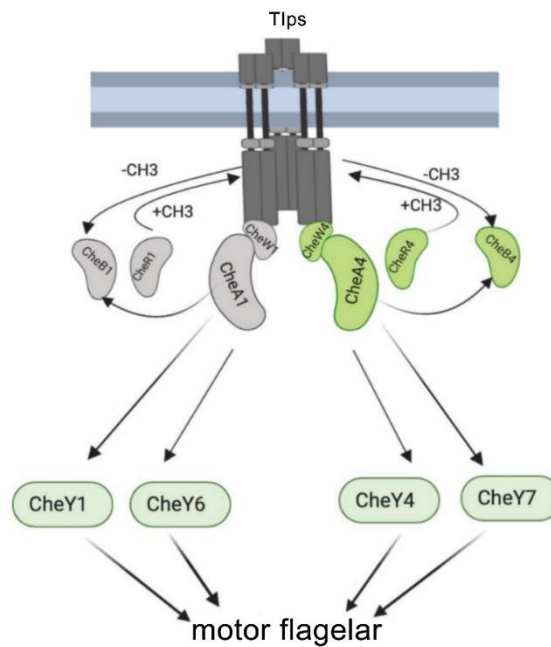


Figura 5. Sistema de quimiotaxis en *Azospirillum brasilense* Sp7. Tomado de (Ganusova et al., 2021) y traducido.

3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Gamboa en 2014 realizó una mutación del gen *dgcE* en *A. baldaniorum* Sp.245, mediante la inserción de un casete de resistencia a kanamicina- β -glucuronidasa (*gusA*-Km^R) con la finalidad de estudiar el papel de proteínas con dominios GGDEF en el crecimiento y bajo condiciones de estrés. La cepa resultante de esta mutación (denominada 5A) presentó un crecimiento disminuido en comparación de la cepa silvestre.

Posteriormente, en el 2016 Ávalos realizó una mutación por eliminación del gen *dgcE*, generando la mutante 7U3. En este caso, no se observaron diferencias significativas en el crecimiento en comparación con la cepa silvestre, lo que sugeriría que la mutante 5A, con la inserción del casete pudo haber generado una mutación polar afectando así el crecimiento. Esto motivó a estudiar los genes río abajo en el mismo contexto genético (Avalos Rangel, 2016).

En 2017, Cordero generó la mutante por eliminación del gen *hkhB* que codifica para una histidina quinasa ($\Delta hkhB$, C5.56), el crecimiento de esta mutante no se ve afectado por el estrés salino y su curva de crecimiento es similar al de cepa silvestre, sin embargo, su movilidad se vio reducida, por lo que, junto con los datos de Ávalos, se plantea la existencia de un sistema de señalización multicomponente relacionado con la movilidad de *A. baldaniorum* Sp245 (Figura 6) (Cordero Rivera, 2017).



Figura 6. Ensayo de movilidad. Se observan las cepas utilizadas *A. baldaniorum* Sp245 (WT), *A. baldaniorum* $\Delta hkhB$ (C5.56), *A. baldaniorum* $\Delta dgcE$ (7U-3) y *A. baldaniorum* *dgcE*: *gusA*:Km (5-A). Tomado de Cordero, 2017

En 2023, Sánchez extendió el análisis de la mutante *A. baldaniorum* $\Delta hkhB$ (C5.56) generada previamente por Cordero, mediante la introducción del plásmido pJB*hkhB*. El estudio fenotípico de las cepas C5.56, C5.56 pJB*hkhB* y C5.56 pJB3Tc20 no reveló diferencias estadísticamente significativas en su crecimiento. Asimismo, Sánchez, investigó la formación de biopelícula durante periodos de 3 y 5 días en medio NFB+KNO₃ para estas mismas cepas. No observó diferencia estadísticamente significativa en ninguno de estos ensayos, no obstante, de forma cualitativa observó una película (biopelícula en la interfase líquido-aire) más densa en las cepas C5.56 y C5.56 pJB3Tc20, a comparación de la cepa silvestre y la cepa

complementada (C5.56 pJBhkhB), lo que podría señalar a HkhB como un regulador negativo de la formación de película (Sánchez Gonzáles, 2023).

Para continuar con el estudio de este grupo de genes con la misma dirección de transcripción y con espacios intergénicos cortos (Figura 7), en 2021 Cardona obtuvo una mutante de *A. baldaniorum* por eliminación de *cheY* (Figura 8), para ello, realizó una conjugación biparental entre *A. baldaniorum* Sp45 y *E. coli* S17.1 pCDR-2FAB, donde esta última posee el vector suicida pCDR-2 y fragmentos A y B río arriba y río abajo de *cheY*, quedando éste excluido, al realizarse un intercambio alélico. Posteriormente, seleccionó las clonas sensibles a Tetraciclina, esto en un medio mínimo con k-malato rojo Congo + Tc siendo las clonas 13, 86 y 87 las adecuadas para ser sembradas en el medio K-malato+ RC+15 % sacarosa, lo que propició el doble entrecruzamiento, generando la mutación por remoción del gen. Finalmente, realizó una PCR con los cebadores forward FA y reverse FB para confirmar la correcta eliminación de *cheY*. Además de la obtención de la mutante, Cardona realizó análisis bioinformáticos de las HQ y RR del SDC de *A. baldaniorum* Sp245. Identificó 45 RR de dominio único en *A. baldaniorum* Sp245 y 41 en *A. brasilense* Sp7, con longitudes variables entre 119 y 629 aminoácidos. También detalló la distribución de los RR de dominio único de *A. baldaniorum* Sp245, encontrando su presencia en el cromosoma, en los crómidos 1,2 y 3 y en el plásmido 4. Los RRs de dominio único de *A. baldaniorum* Sp. 245 se encuentran en sistemas de quimiotaxis canónicos, pero también cerca de proteínas de doble componente, de regulación transcripcional, transporte de aminoácidos, sistemas de fosfotransferasa (PTS) e incluso se localizaron genes huérfanos. Asimismo, se encontraron los dos operones de quimiotaxis canónicos similares a *A. brasilense* Sp7 (Cardona Baltazar, 2021). Cardona también analizó la filogenia de algunas CheY, dilucidando que CheY1, CheY4, CheY6 y CheY7 de *A. brasilense* Sp7 y CheY de *E. coli* comparten un ancestro en común ya que se encuentran en una misma rama filogenética, mientras que CheY-L no. CheY-L comparte rama filogenética con proteínas de la cepa 12001 y MTCC4035 aisladas en Brasil e India, respectivamente.

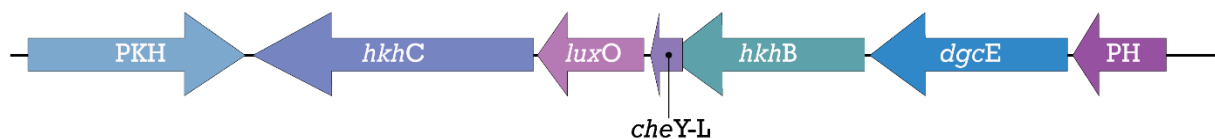


Figura 7. Contexto genético de *cheY*

Mediante un alineamiento de estructuras tridimensionales con el software Clustal Omega, Cardona constató que CheY-like tiene una estructura secundaria típica de otras proteínas CheY: 5 α hélices y 5 β plegadas. Se encontró el aminoácido aspartato, para la recepción de fosfato en el final de la β plegada 3, eso se verificó tanto en alineamientos de secuencia como en comparación de estructuras entre la CheY-L de *A. baldaniorum* Sp245 y la CheY de *E. coli* (Figura 9) donde observó que los aminoácidos que participan en la fosforilación de la proteína CheY se encuentran también altamente conservados en la proteína CheY-L. No encontró en CheY-L los aminoácidos que intervienen en el cambio conformacional estructural ni los que participan con la interacción con el grupo fosfato o sus análogos, ni los que median la interacción con FlIM de *E. coli*.

Adicionalmente, exploró la presencia de la región rica en arginina, característica de las proteínas Cle (*CheY-like c-di-GMP effectors*) y responsable de su unión con di-GMPc para activar el motor flagelar en *C. crescentus* (Nesper et al., 2017), sin embargo, se encontró ausente en CheY-L.

Aunque el estudio previo proporciona una caracterización detallada de *cheY*, no determina su función, por lo tanto, resulta esencial expandir la gama de experimentos realizados para acercarnos a definir funciones asociadas a su fenotipo.

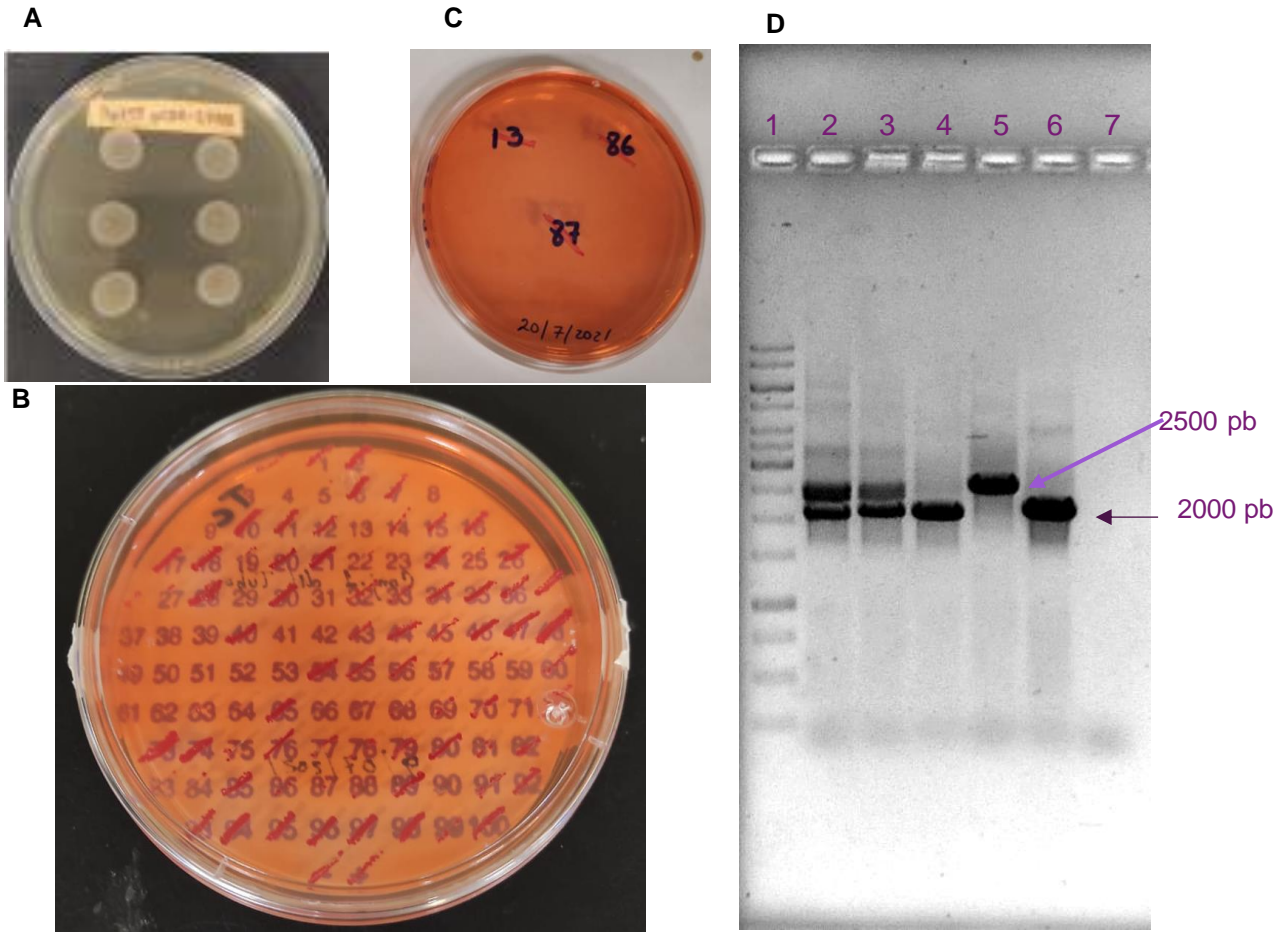


Figura 8. Generación de *A. baldaniorum* Δ *cheY*-L. A conjugación biparental entre *A. baldaniorum* Sp45 y *E. coli* S17.1 pCDR-2FAB, donde esta última posee el vector suicida pCDR-2 y fragmentos A y B río arriba y río abajo de *cheY*. B. Cultivo de las clonas en un medio mínimo con k-malato rojo Congo +Tc para seleccionar las clonas sensibles a tetraciclina. C. Clonas seleccionadas. D.PCR para comprobar la eliminación de *cheY*-Like; Carril 1: el marcador de peso molecular; Carril 2:clona 12; Carril 3: clona 86; Carril 4: clona 87; Carril 5: *A. baldaniorum* y Carril 6: *E. coli* S17.1 pCDR-2FAB. Tomado de (Cardona 2021).

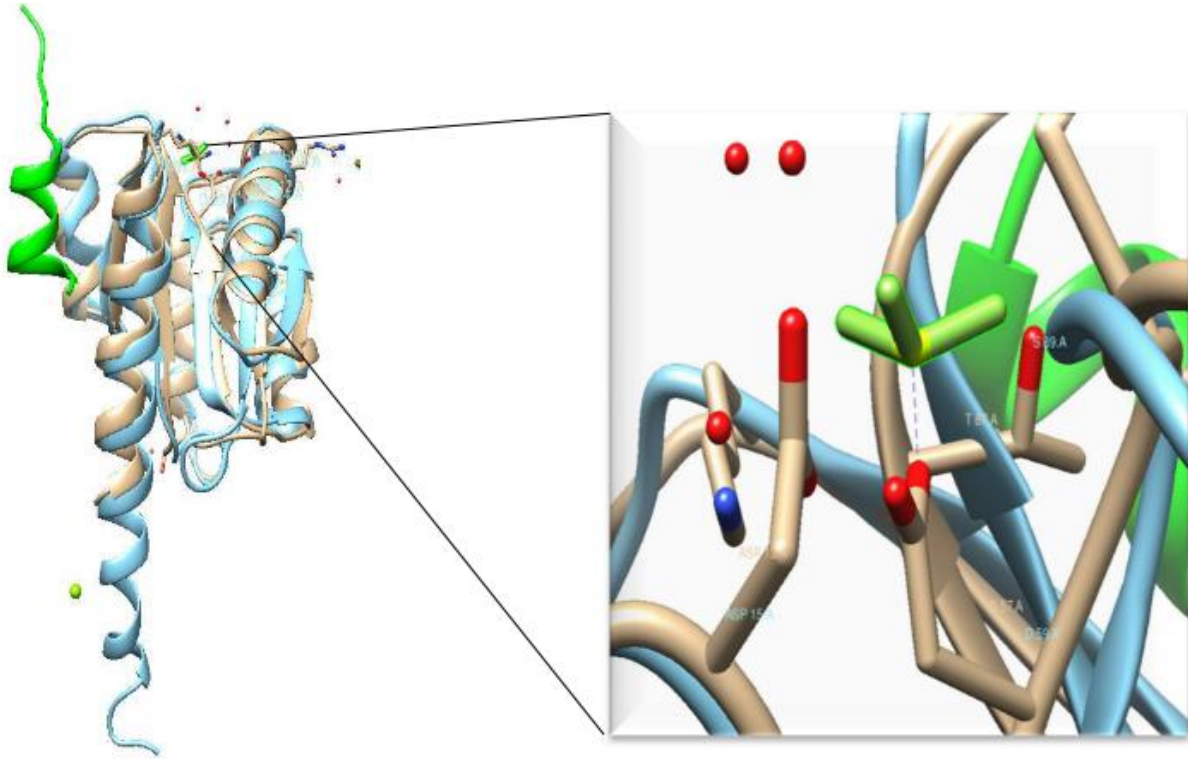


Figura 9. Alineamiento de las secuencias de las proteínas CheY de E. coli (café claro) y CheY-like de A. baldaniorum (azul). FliM de color verde. La ampliación de la imagen muestra algunos de los aminoácidos que participan en la fosforilación del Aspartato (D) posición 12, 13 y 59. Alineamiento realizado mediante Clustal Omega.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar el fenotipo del gene *cheY*-like en *A. baldaniorum* Sp245

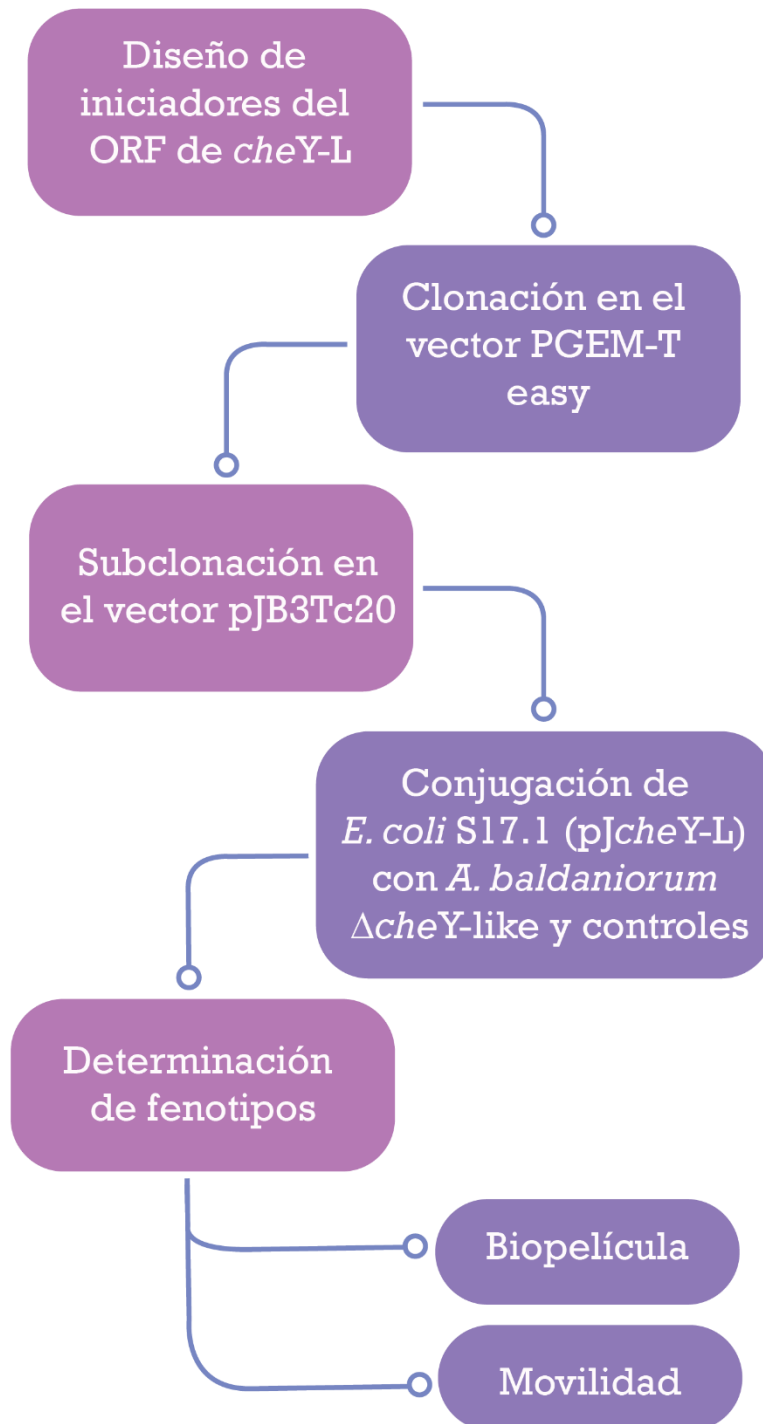
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Comparar la movilidad de la cepa mutante $\Delta cheY-L$ y la cepa complementada con la cepa silvestre.
- Analizar la formación de biopelículas de la mutante $\Delta cheY-L$, y la mutante complementada comparadas con el gen silvestre.

5. HIPÓTESIS

La proteína CheY-L de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 está implicada en la movilidad del flagelo y/o en la formación de biopelícula.

6. ESQUEMA DE TRABAJO



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 MATERIAL BIOLÓGICO

7.1.1 Cepas

Cepa	Descripción	Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>hds17 endA1 thi-1 gyrA96 relA1 recA1 supE44 Δ-lacU169 (ϕ8odlacZ ΔM15)</i>	Gibco–BR
<i>Escherichia coli</i> S17.1	<i>E. coli</i> Res– Mod+ <i>recA proA thi</i> integrated plasmid RP4 Tc::Mu Km::Tn7 Tra+ SmR, SpR, TpR	(Simon, et al., 1983)
<i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245	Cepa silvestre	(Baldani et al., 1986)
<i>A. baldaniorum</i> Δ <i>cheY</i> -L	Derivada de Sp245, Δ <i>cheY</i>	(Cardona, 2021)
<i>A. baldaniorum</i> Δ <i>cheY</i> -L <i>pJcheY</i> -L	Derivada de <i>A. baldaniorum</i> Δ <i>cheY</i> , alberga el plásmido <i>pJcheY</i> , Amp ^R , Tc ^R	Este trabajo
<i>A. baldaniorum</i> <i>pJcheY</i> -L	Derivada de <i>A. baldaniorum</i> Sp245, alberga el plásmido <i>pJcheY</i> , Amp ^R , Tc ^R	Este trabajo
<i>A. baldaniorum</i> Δ <i>cheY</i> -L <i>pJB3Tc20</i>	Derivada de <i>A. baldaniorum</i> Δ <i>cheY</i> , alberga el plásmido <i>pJB3Tc20</i> , Amp ^R , Tc ^R	Este trabajo
<i>A. baldaniorum</i> <i>pJB3Tc20</i>	Derivada de <i>A. baldaniorum</i> Sp245, alberga el plásmido <i>pJB3Tc20</i> , Amp ^R , Tc ^R	Este trabajo

7.1.2 Vectores

Plásmido	Descripción	Referencia
pGEM [®] -T Easy	<i>lac</i> , Amp ^R	(Promega Corporation, 2018)
PGEM <i>cheY</i> -L	Derivado del plásmido pGEM [®] -T Easy con la inserción del gen <i>cheY</i> -L de <i>A. baldaniorum</i> Sp245	Este trabajo
<i>pJB3Tc20</i>	Amp ^R , Tc ^R	(Blatny et al., 1997)
<i>pJcheY</i> -L	Derivado del plásmido <i>pJB3Tc20</i> con la inserción	Este trabajo

del gen *cheY-L* de *A. baldaniorum* sp245

7.1.3 Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia (5'-3')	%GC	T.M.
M13F	GTAAAACGACGGCCAG	56%	51°C
RpJB3T	ACAATCAGCTACTTCACTGTTG	41%	54°C
R <i>cheY</i> -EcoRI	*GAATTCACCCGATCATGGCTCATTGG	50%	55.7°C
F <i>cheY</i> -BamHI	*GGATCCAATTGGGTTGCCGTTTCATA	48%	52.3°C
FTetra	CGTGAAACCCAACATACCC	53%	54°C
RTetra	CGTCCCTATCGTTTCCACG	58%	56°C

*Las bases marcadas en rojo corresponden a las secuencias que cortan las enzimas de restricción

7.2 METODOLOGÍA

7.2.1 Diseño de iniciadores del ORF de *cheY-L*

Para poder realizar los análisis y mutaciones subsecuentes, se localizó el gen *cheY-L* (AZOBR_p310005, **Figura 10**) en el genoma de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 (HE577330.1) en la base de datos GenBank de NIH (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Se utilizaron los softwares *Primer Blast* de NHI y *Oligo Analyzer* de IDT para la determinación y análisis de los parámetros específicos de ambos iniciadores, además de *SnapGene* para la visualización de gráficos y análisis *in silico*.

Se tomaron en cuenta las siguientes características para el diseño de oligonucleótidos (Mancilla Simbro et al., 2021):

- Tamaño de 19-25 pb.
- Temperaturas de fusión cercanas entre el par de iniciadores
- Baja formación de *hairpins* (estructuras de horquilla o bucles en una cadena)
- Baja cantidad de homo-dímeros y ΔG mayor a -8
- Contenido de G-C entre 40 y 60%

Finalmente se agregaron sitios de corte para las enzimas *BamHI* y *EcoRI*.

7.2.2 Análisis de secuencias

Con la finalidad de contar con la certeza de trabajar con las construcciones correctas, estas fueron enviadas a la unidad de síntesis y secuenciación (USSDNA) del instituto de biotecnología de la UNAM y se analizaron mediante la herramienta de software *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) desarrollada por el *National Institutes of Health* (NIH) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para este propósito se llevaron a cabo comparaciones utilizando los algoritmos BLASTN (coteja secuencias de nucleótidos con secuencias de nucleótidos de bases de datos) y BLASTX (compara nucleótidos traducidos con secuencias de proteínas de bases de datos).

7.2.3 Cultivos celulares

Para garantizar la disponibilidad de las células necesarias en cada experimento se realizaron los cultivos de las siguientes células:

7.2.3.1 *E. coli*

Se cultivó en tubos con medio líquido LB a 30°C con agitación y las colonias aisladas se obtuvieron sembrando mediante estría cruzada en placas con medio LB e incubadas a 37°C durante 24 h. Dependiendo del caso, se añadió el antibiótico correspondiente.

7.2.3.2 *A. baldaniorum*

Se emplearon caldos de cultivo K-lactato, K-malato, MD y LB* a 30°C con agitación y las colonias aisladas se obtuvieron sembrando mediante estría cruzada en placas con medio Rojo Congo e incubadas a 30°C durante 48h. Dependiendo la cepa, se añadió el antibiótico correspondiente.

7.2.4 Extracción de ADN

Para asegurar la disponibilidad del material genético necesario en los experimentos se realizaron distintos tipos de extracción descritos a continuación:

7.2.4.1 Genómico

Se utilizaron 5 ml de cultivo en fase logarítmica tardía de la cepa de análisis. El tiempo de cultivo varía de 16 h (En el caso de *E. coli* o *A. baldaniorum* en medio rico) a 24 h (en el caso de *A. baldaniorum* Sp245 en medio mínimo). Se centrifugó el cultivo y el pellet obtenido se lavó con buffer TE y se realizó el protocolo de extracción rápida mediante fenol-cloroformo de Cheng & Jiang, 2006.

7.2.4.2 Plasmídico

El cultivo se centrifugó y el pellet obtenido se lavó con buffer TE, se realizó la maxi o minipreparación (dependiendo del volumen del cultivo) de lisis alcalina con SDS para la extracción plasmídica (Sambrook & Russell, 2001). En el caso de la extracción de ADN de cepas de *A. baldaniorum* Sp245, se extendió el tiempo de centrifugación después de la lisis celular a 20 minutos con el propósito de separar y eliminar la mayor cantidad posible de exopolisacáridos y proteínas. Como alternativa, se desarrolló una metodología de extracción adaptada a *A. baldaniorum* Sp245, descrita detalladamente en la sección 13.2 de anexos.

Todas las muestras de ADN se almacenaron a -20°C para su preservación.

7.2.5 Clonación por ligación de *cheY-L* en pGEM-T Easy

Con el propósito de insertar el gen de interés *cheY-L* en el vector de almacenamiento, se amplificó el gen *cheY-L* a partir de ADN genómico de *A. baldaniorum* Sp245, utilizando los cebadores *FcheY-BamHI* y *RcheY-EcoRI* diseñados para este proyecto y una enzima polimerasa de alta fidelidad, siguiendo los protocolos de PCR presentados en Anexos. La recuperación de la amplificación del gel se realizó mediante el kit *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit* de *Zymo Research*.

La ligación se llevó a cabo siguiendo el protocolo indicado en (Promega Corporation, 2018) para el manejo de vectores pGEM. La reacción se incubó durante toda una noche a 4°C para obtener una mayor eficiencia en la ligación.

7.2.6 Transformación de *E. coli*

Con el fin de introducir la construcción genética pGEM*cheY*-L en *E. coli*, se llevó a cabo la transformación de células competentes:

7.2.6.1 Preparación de células competentes

Se siguió el protocolo para la preparación de células *E. coli* competentes usando cloruro de calcio (Sambrook & Green, 2012). Se utilizó medio LB para el crecimiento y almacenamiento de los cultivos celulares.

7.2.6.2 Transformación

Se incorporaron las células competentes y el material genético a KCM, se mantienen en hielo durante 30 minutos y se realiza un choque térmico a 42°C (Sambrook & Green, 2012).

En el caso de la construcción pGEM-*cheY*-L, el inserto debe interrumpir la secuencia de β-galactosidasa, por lo que se buscarán las colonias blancas en un cultivo previamente añadido con X-gal. En la transformación con p*JcheY*-L o se utiliza tetraciclina para seleccionar las transformantes.

7.3 SUBCLONACIÓN DE *cheY*-L DE pGEM-T EASY A pJB3Tc20

Para obtener la construcción final que será insertada en las cepas de interés de *A. baldaniorum*, se extrajo el plásmido pGEM-*cheY*-L de *E. coli* DH5α y se realizó una restricción con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI, lo que nos permitirá obtener el gen *cheY*. Este se liga al plásmido pJB3Tc20 para obtener la construcción p*JcheY*-L que se transforma en la cepa *E. coli* DH5α y S17.1.

7.4 CONJUGACIONES

Con el objetivo de transferir la construcción de interés p*JcheY* a *A. baldaniorum*, se siguió el protocolo de conjugación de *A. brasilense* Sp7 de (Gullett et al., 2017), utilizando cultivos en medio LB para *E. coli* y MD o LB* para *A. baldaniorum* Sp245 de 3 y 6 horas respectivamente, obtenidos a partir de precultivos del día anterior. La conjugación se sembró en placas de MD o LB*. La selección de colonias transconjugantes de *A. baldaniorum* Sp245 se realizó a partir de varios cultivos consecutivos en KL con Rojo Congo y Nfb. Las conjugaciones se realizaron de *E. coli* S17.1 p*JcheY*-L a *A. baldaniorum* y *A. baldaniorum* Δ*cheY*-L, así como la obtención de los controles de las cepas con el vector vacío.

7.5 CUANTIFICACIÓN DE BIOPELÍCULA

Para determinar la cantidad de biopelícula y compararla entre cada una de las cepas, se utilizó el protocolo para el análisis de biopelícula (Dario Cassán et al., 2015) y (Arruebarrena Di Palma et al., 2013), adaptado a placa de pocillos y tubos de ensayo. La determinación de la biopelícula formada durante 5 días se realizó mediante tinción con cristal violeta (CV), dejando incubarlo durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para la cuantificación, se añadió ácido acético a cada pocillo y se midió su absorbancia a 540 nm (Kolter, 1998). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

7.6 MOVILIDAD

Para evaluar las diferencias del desplazamiento de las cepas de interés, se realizaron ensayos de movilidad en placa suave, se llevaron a cabo en placas Petri con base K y agar al 0.25% según el método descrito por (Dario Cassán et al., 2015). Los quimioattractantes seleccionados para este estudio fueron malato, lactato y prolina, utilizados a una concentración de 10 mM. Una vez esterilizado el medio, se

permitió que descendiera su temperatura antes de vaciarlo a las placas. Posteriormente se dejaron reposando con el mechero encendido durante un lapso de 10 minutos tras lo cual se cerraron las cajas y se dejaron reposar durante 40 minutos o hasta que el medio ya no presentara un aspecto líquido al mover ligeramente la caja. Las cepas por analizar se cultivaron hasta alcanzar una DO_{600} de entre 0.45-0.47. Se inocularon 5 μ l de cultivo justo en el centro de la caja y se incubaron de forma que ninguna caja Petri quedó encima de otra. La evaluación de la movilidad se realizó midiendo el diámetro del halo a las 24 y 48 horas, siguiendo el protocolo establecido por (Maya, 2019). Cada ensayo experimental incluyó la utilización de tres placas por cada cepa analizada, realizándose un total de tres repeticiones del ensayo independientes.

7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Con el fin de validar y determinar la significancia de las diferencias observadas entre las cepas, se llevaron a cabo gráficos y análisis estadístico t-test de los resultados de movilidad y biopelícula con el software Sigma Plot v. 12.0. En todos los casos se comparó la sepa silvestre (*A. baldaniorum* Sp. 245 con las mutantes y controles, además de la mutante $\Delta cheY$ -L con su control.)

8. RESULTADOS

8.1 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

	Secuencia 5'→3'	longitud	T.f.	%G C	T. de formación de horquillas	ΔG menor de homodímeros	ΔG menor de heterodímeros
FcheY-BamHI	*GGATCCAATTGG GTTGCCGTTCATA	19	52.3	42.1	27.7, 20	-5.36 kcal/mol	
RcheY-EcoRI	*GAATTCACCCGA TCATGGCTCATTG G	20	55.7	55	20.1, 15.6, 8.2, 10, -4.3, 11	-5.38 kcal/mol	-7.48 kcal/mol

Tabla 1. Características de cebadores diseñados para *cheY-L* de *A. baldaniorum* Sp245. *Las bases marcadas en rojo corresponden a las secuencias que cortan las enzimas de restricción

En la **Tabla 1** se muestran los iniciadores y sus características para la amplificación del gen *cheY-L* de *A. baldaniorum* Sp245 (**Figura 10**) que permitirá realizar la clonación del gen en los plásmidos y su posterior inserción en las cepas de interés. Se agregaron las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI a conveniencia del sentido de inserción en el plásmido pJ3Tc20. El tamaño de amplificación es de 555 pb (**Figura 11**). El funcionamiento de los oligonucleótidos se comprobó realizando una PCR de ADN genómico de *A. baldaniorum* Sp245 (**Figura 12**).

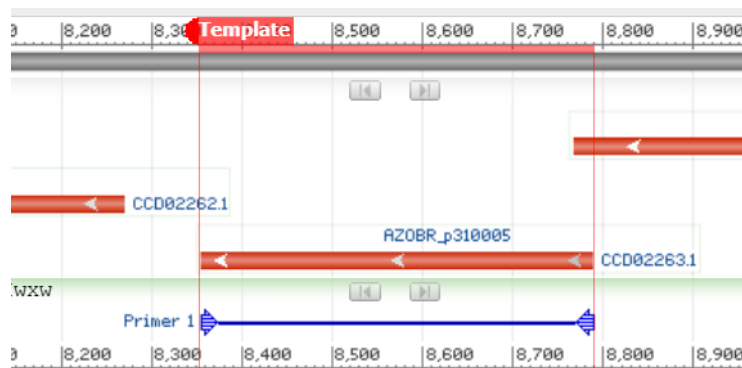


Figura 10. Contexto genético de *AZOBR_p310005* (*cheY-L*) en la base de datos GenBank

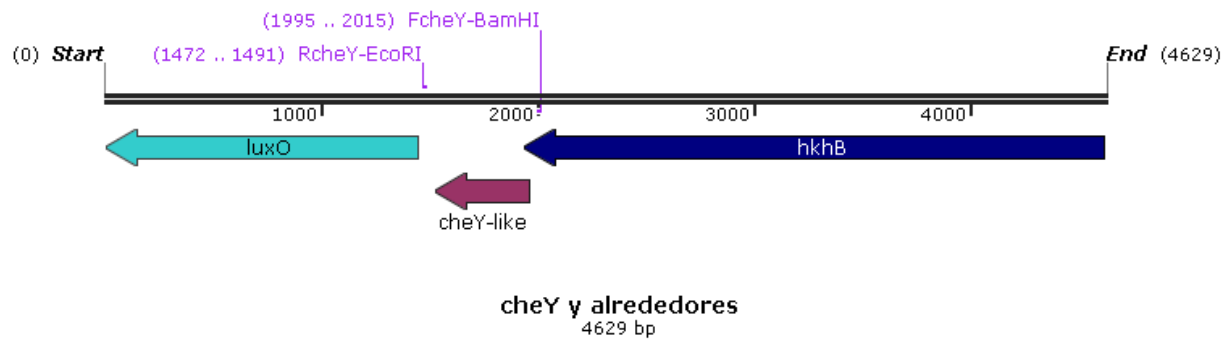


Figura 11. Sitio de unión de oligonucleótidos de cheY-L

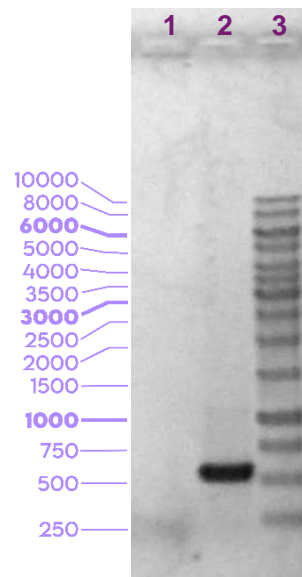


Figura 12. PCR de cheY-L. Se utilizaron los oligonucleótidos FcheY-BamHI y RcheY-EcoRI. Carril 1: Blanco de reactivos, Carril 2: Amplificación de cheY-L de *A. baldaniorum* Sp 245 con peso de 555 pb, Carril 3: Marcador de peso molecular (MPM)

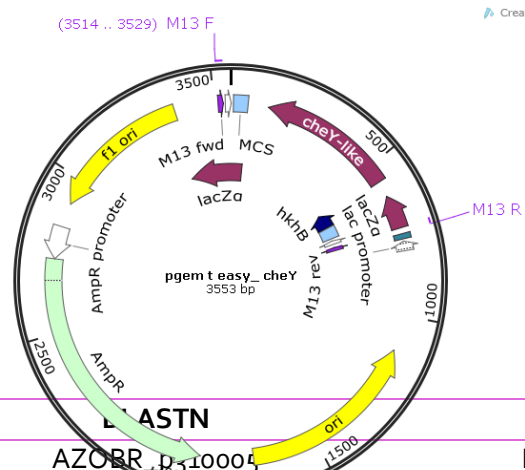
8.2 CLONACIÓN DE cheY-L EN pGEM-TEASY

Con el propósito de alojar el gen de interés de manera estable, se realizó la primera clonación en un plásmido de reserva. Esto permitió una preservación efectiva, además de la disponibilidad del gen para análisis posteriores. Esta fase experimental se efectuó a partir de la ligación de cheY-L de *A. baldaniorum* Sp 245 al plásmido de almacenamiento pGEM-T easy, obteniendo la construcción pGEMcheY-L (Figura 13.A). Este vector se transformó en la cepa de almacenamiento *E. coli* DH5 α , la cual permite el mantenimiento y replicación estable del plásmido. A partir de las cepas transformantes, se seleccionaron

las clonas 16 y 36 de donde se extrajo el vector y se comprobó la correcta construcción realizando una restricción con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI, (sitios incluidos en los cebadores). Se obtuvieron los fragmentos esperados: 2998 pb correspondientes al plásmido y 555 pb pertenecientes a *cheY*-L (Figura 13 B).

8.3 SECUENCIACIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN pGEM*cheY*-L

Con la finalidad de confirmar la integridad y autenticidad de la construcción realizada, el plásmido pGEM*cheY*-L se envió a secuenciar a la unidad de síntesis y secuenciación (USSDNA) del instituto de



Resultado:	BLASTN		BLASTX	
	E value	% Identidad	E. value	% Identidad
Sec. cebador M13 directo	0.0	100%	7.16e-96	100%
Sec. cebador M13 reverso	0.0	99.45%	7.16e-95	99.31%

Figura 13. Construcción pGEM*cheY*-L. Se incluyen los cebadores M13 utilizados para la secuenciación, señalados en morado.

biotecnología de la UNAM. Los resultados obtenidos constan de sección del plásmido que abarcan los oligonucleótidos M13 (Figura 14). El BLASTN de la secuencia obtenida a partir del cebador M13 F arrojó un alineamiento con el gen AZOBR_p310005 (*cheY*-L de *A. baldaniorum* Sp245) con un porcentaje de identidad del 100% y un *e. value* de 0.0, este mismo análisis de la secuencia a partir del cebador M13 R presentó este mismo alineamiento con el mismo valor de *e. value* pero un porcentaje de identidad de 99.45%. Por otra parte, el análisis por BLASTX de la secuencia a partir del cebador M13 F mostró un porcentaje de identidad del 100% con un regulador de respuesta (RR) de *A. baldaniorum* Sp245 y un 71.64% con un RR del género *Azospirillum*. La secuencia a partir del M13 R exhibió los mismos resultados, pero con porcentajes de identidad de 99.31 y 71.64% respectivamente. Los *e. values* de este análisis se mantuvieron bajos. Los resultados anteriores se resumen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Resultados del análisis de la secuencia de *cheY*-L. Se secuenció a partir de los cebadores M13 en pGEM*cheY*-L.

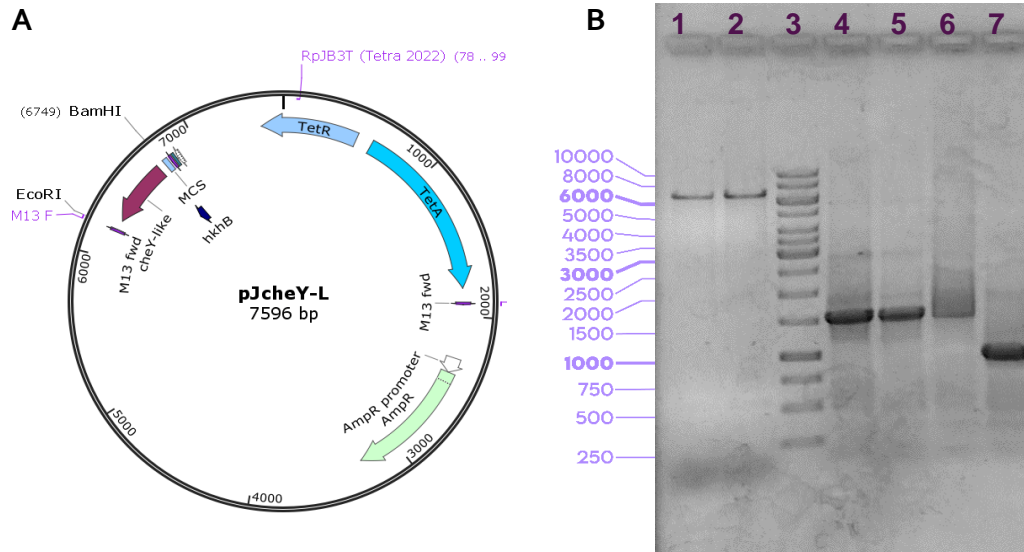


Figura 14. Construcción pJcheY-L y su comprobación. A. Se muestra pJcheY-L con los sitios de unión de los oligonucleótidos RpJB3T y M13F y los sitios de corte de las enzimas EcoRI y BamHI. B. Carril 1: restricción de pJcheY-L en *E. coli* S17.1 con BamHI y EcoRI clona 4, carril 2: Mismas restricción con la clona 24, carril 3: MPM, carril 4: PCR de pJcheY-L en la clona 24 de *E. coli* S17.1, carril 5: misma PCR en clona 4, carril 6: misma PCR en clona 60, carril 7: misma PCR en *E. coli* S17.1 pJB3Tc20.

8.4 SUBCLONACIÓN EN EL VECTOR pJB3TC20 PARA OBTENER LA CONSTRUCCIÓN pJcheY-L

Con la finalidad de transferir el gen de interés *cheY-L* del vector de almacenamiento al plásmido pJB3Tc20, se realizó la subclonación. El producto resultante de la restricción del plásmido pGEM*cheY-L* por las enzimas *EcoRI* y *BamHI* fue ligado al vector pJB3Tc20, previamente linearizado, empleando las mismas enzimas. Se comprobó esta construcción mediante la restricción con enzimas antes mencionadas, esperando una banda de 7041 pb correspondiente al plásmido y otra de 555 pb que representa el fragmento de *cheY-L* (Figura 15 B). Dado que esta última banda tiene un bajo peso molecular, presenta una menor intensidad en el gel y su detección en nuestros análisis resultó limitada.

Además, se analizó la construcción mediante una amplificación con los oligonucleótidos RpJB3T y M13 (Figura 15) que dio como resultado una banda de 1513 pb, que corresponde al peso predicho bioinformáticamente. En este análisis se estableció como control negativo el plásmido pJB3Tc20 cuya banda es de 958 pb.

8.5 SECUENCIACIÓN DEL PLÁSMIDO pJcheY-L

	BLASTN		BLASTX	
Resultado:	AZOBR_p310005		RR de <i>Azospirillum</i>	
	E value	% Identidad	E. value	% Identidad

Sec. cebador M13 directo	0.0	99.81%	8×10^{-95}	99.31%
-------------------------------------	-----	--------	---------------------	--------

Tabla 3. Resultados del análisis de la secuencia de cheY-L. Se secuenció a partir de los cebadores M13F y RpJB3T en pJcheY-L

Para confirmar la construcción pJcheY, se secuenció y se analizó por medio de BLASTN y BLASTX el segmento correspondiente a los cebadores M13 y RpJB3T (**Tabla 3**). La evaluación de la secuencia obtenida a partir del cebador M13 reveló en el BLASTN un alineamiento con una región del plásmido 3 de *A. baldaniorum* Sp245 correspondiente al gen AZOBR_p310005, obteniendo un *e. value* de 0.0 y un porcentaje de identidad de 99.81%. Simultáneamente, el análisis BLASTX presentó un alineamiento con un regulador de respuesta del género *Azospirillum* con un *e. value* de 8×10^{-95} y un porcentaje de identidad de 99.31%. En el mismo contexto, el BLASTN de la secuencia derivada del cebador RpJB3T reveló un 100% de identidad y un *e. value* de 2×10^{-47} con la proteína represora de tetraciclina de clase B del transposón Tn10 de *Klebsiella pneumoniae*. Este hallazgo concuerda con las expectativas, considerando que esta porción de la construcción abarca parte del gen de resistencia a tetraciclina perteneciente al plásmido pJB3Tc20.

8.6 COMPROBACIÓN DE LAS CLONAS SELECCIONADAS DE *A. baldaniorum* CON LA CONSTRUCCIÓN P*JcheY-L*

Con la intención de confirmar la presencia de *cheY-L* y de esta forma contribuir a la comprobación de la fiabilidad de la construcción, se realizó una PCR de *cheY-L* a partir de los plásmidos p*JcheY-L* extraídos. Se emplearon los cebadores RpJB3Tc20 y M13F que amplifican un fragmento de 1500 pb, como se muestra en la **Figura 16**. Dos clonas de cada conjugación fueron elegidas para este ensayo: la 48 y la 42 de *A. baldaniorum* Sp245 + p*JcheY-L* y la 5 y 34 de *A. baldaniorum* Δ *cheY-L* + p*JcheY*. A partir de este ensayo se seleccionaron las clonas 34 y 48 para continuar con los experimentos.

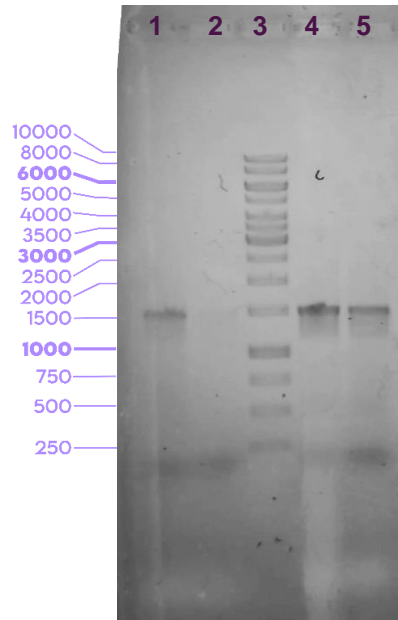


Figura 15. Amplificación de p*JcheY-L* en *Azospirillum*. Se emplearon los cebadores RpJB3T y M13F, se espera un amplificado de 1500 pb. Carril 1: *A. baldaniorum* p*JcheY-L* clona 48, carril 2: misma cepa, clona 42, carril 3: MPM, carril 4: *A. baldaniorum* Δ *cheY-L* + p*JcheY-L* clona 5, carril 5: misma cepa, clona 34.

Para contribuir a la evaluación de la integridad de la construcción se llevó a cabo con una enzima cuyos sitios de restricción se encuentran en puntos relevantes que permiten el análisis de la presencia del gen de interés, en el plásmido p*JcheY-L*. La restricción se realizó con la enzima *PvuI*, esta cuenta con 6 sitios de restricción en el vector (**Figura 17 A**). Cuando *cheY-L* se encuentra en el vector, el fragmento que lo alberga tiene un peso de 2864 pb, mientras que sin contar con *cheY-L* su peso es de 2337 pb, esta diferencia es la que nos permite comprobar la inserción de *cheY-L* en el vector. Los demás fragmentos tienen el mismo tamaño en ambos plásmidos.

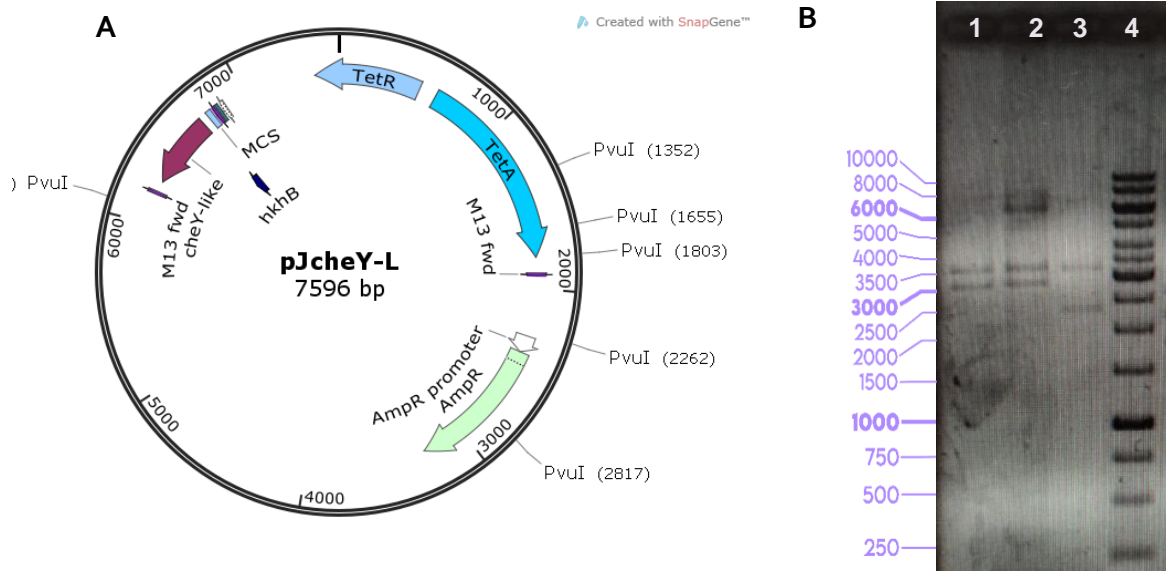


Figura 16. Restricción con PvuI. A. Mapa de *pJcheY-L* donde muestra los sitios de corte de *PvuI* **B.** Restricción de *pJcheY-L*. Carril 1: *A. baldaniorum* Δ *cheY-L* *pJcheY* clona 34, carril 2: *A. baldaniorum* *pJcheY* clona 48, carril 3: *pJcheY-L*, carril 4: MPM

8.7 CURVAS DE CRECIMIENTO

Para obtener una representación temporal del crecimiento de cada cepa, se realizaron curvas de crecimiento. Estos análisis nos permitieron observar si las mutaciones afectan la viabilidad. Se realizó un ensayo por triplicado de curvas de crecimiento de las cepas obtenidas (*A. baldaniorum* *pJcheY-L*, *A. baldaniorum* *pJB3Tc20*, *A. baldaniorum* Δ *cheY-L* *pJcheY-L* y *A. baldaniorum* Δ *cheY-L* *pJB3Tc20*), *A. baldaniorum* *Sp 245* y *A. baldaniorum* Δ *cheY-L* inoculadas en matraces con 20 ml de medio LB* 10mM de NaCl e incubadas a una temperatura constante de 30°C.

En la **Figura 18** se observa como *A. baldaniorum* Δ *cheY-L* y *A. baldaniorum* *Sp245* muestran crecimiento similar; mientras que las cepas que contienen el plásmido presentaron un retardo en el crecimiento. En particular *A. baldaniorum* Δ *cheY-L* *pJcheY* es la cepa con el menor crecimiento, seguida por *A. baldaniorum* Δ *cheY-L* *pJcheY-L*. Por otra parte, las cepas *A. baldaniorum* *pJcheY-L* y *A. baldaniorum* *pJB3Tc20* muestran un crecimiento similar, excepto a la hora 22, en donde *A. baldaniorum* *pJcheY* tiene un ligero aumento en su crecimiento.

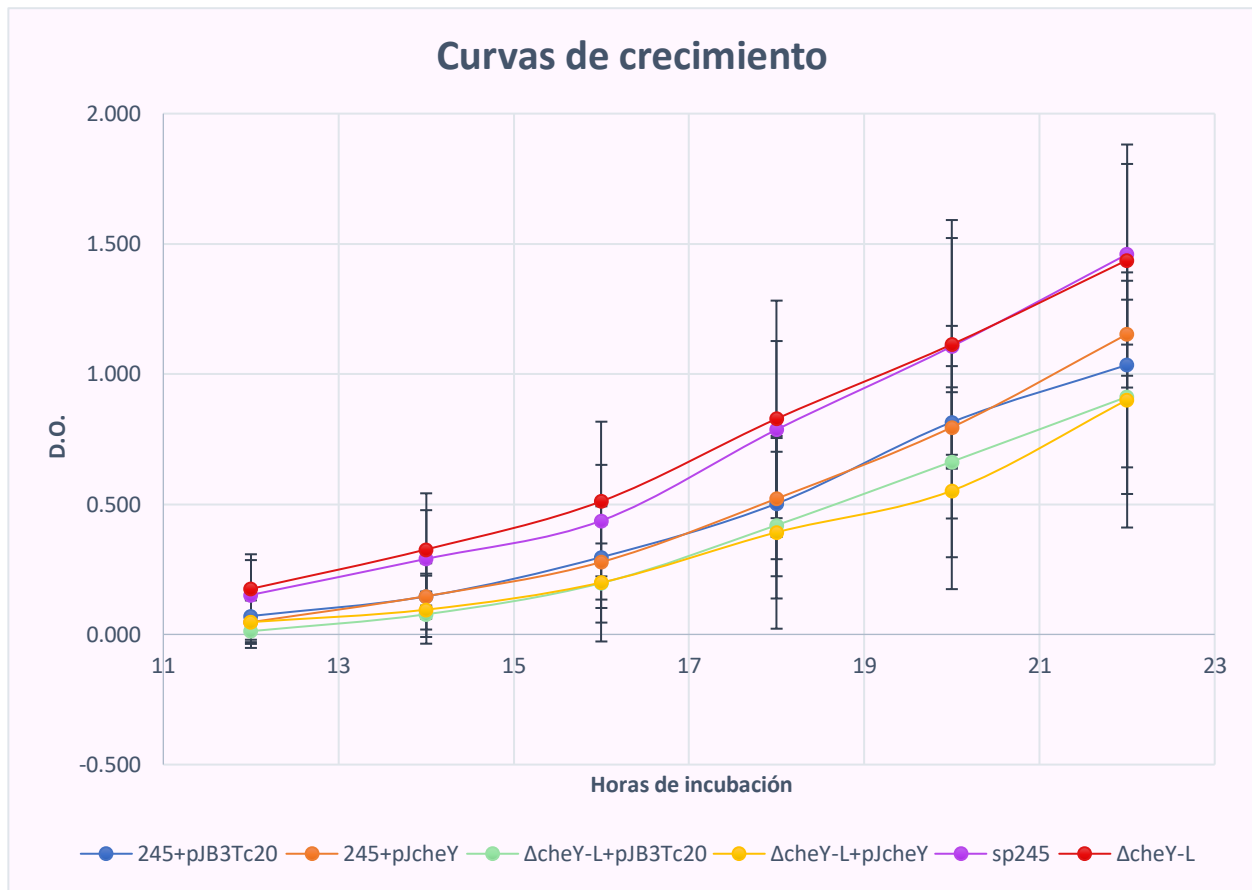


Figura 17. Curvas de crecimiento. Cada línea representa el promedio de tres ensayos independientes. Se muestra la desviación estándar en cada gráfica.

8.8 BIOPELÍCULA

Para cuantificar y comparar la biopelícula generada por cada cepa y de esta forma revelar si *cheY-L* interfiere en este fenotipo, se efectuaron ensayos de formación de biopelícula, los cuales fueron medidos en términos de D.O. con relación a la cantidad de proteína (mg/ml) en cada muestra (**Figura 19 A**). A pesar de observarse una ligera mayor producción de biopelícula en la cepa mutante ($\Delta cheY-L$), no se puede observar diferencias estadísticamente significativas en la producción de biopelícula entre las cepas. En la **Figura 19 B** se muestran fotografías representativas del ensayo de formación de biopelícula, los tubos se encuentran en el mismo orden que las cepas en el gráfico.

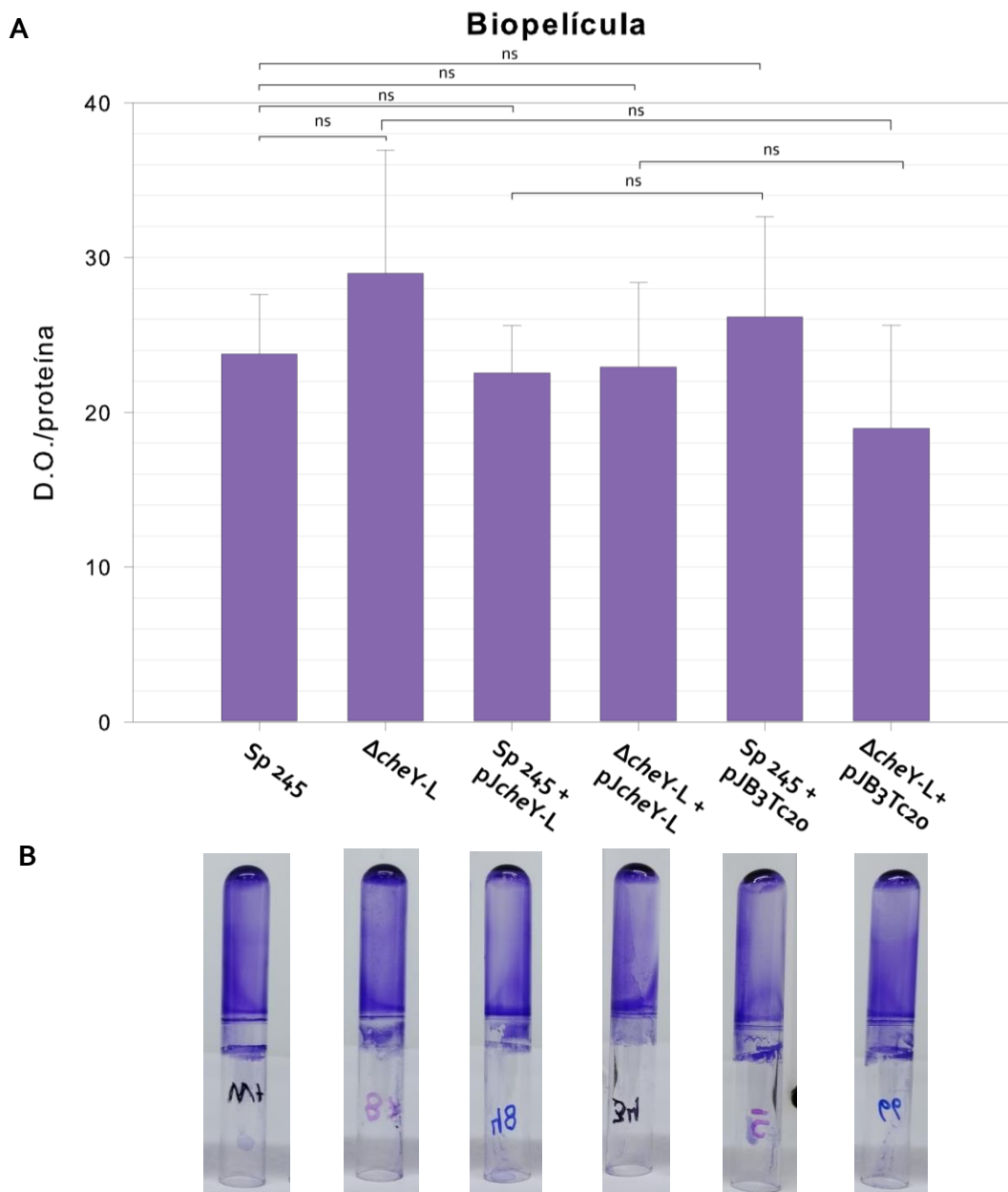


Figura 18. A. Cuantificación de formación de biopelícula. Cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes con cuatro replicas cada uno. También se muestra la desviación estándar mediante una línea a la mitad de la barra, así como la significancia estadística, ns= No significativo. **B. Biopelícula teñida con CV.** Cada fotografía se encuentra debajo de su respectiva cepa en el gráfico.

8.9 MOVILIDAD

Para observar y cuantificar la capacidad de desplazamiento de las distintas cepas y de esta forma exponer si *cheY-L* tiene alguna relación con este fenotipo, se realizaron ensayos de movilidad en placa suave, estos se llevaron a cabo en medio base K con los quimioattractantes Malato, lactato y prolina con una concentración de 10 mM y agar a un 0.25%.

8.9.1 Movilidad hacia malato

En la **Figura 20** se presenta el gráfico del ensayo de movilidad de las cepas en presencia de malato como quimioattractante. Tanto *A. baldaniorum* Sp245 como $\Delta cheY-L$ muestran movilidad similar a las 48 h en comparación con la mutante portadora de los plásmidos vector vacío (control) y pJ*cheY-L*. Esta tendencia es evidente en las fotografías del ensayo (**Figura 21**), cabe destacar que no se detectó una diferencia significativa en la movilidad a las 48 h entre estas dos cepas.

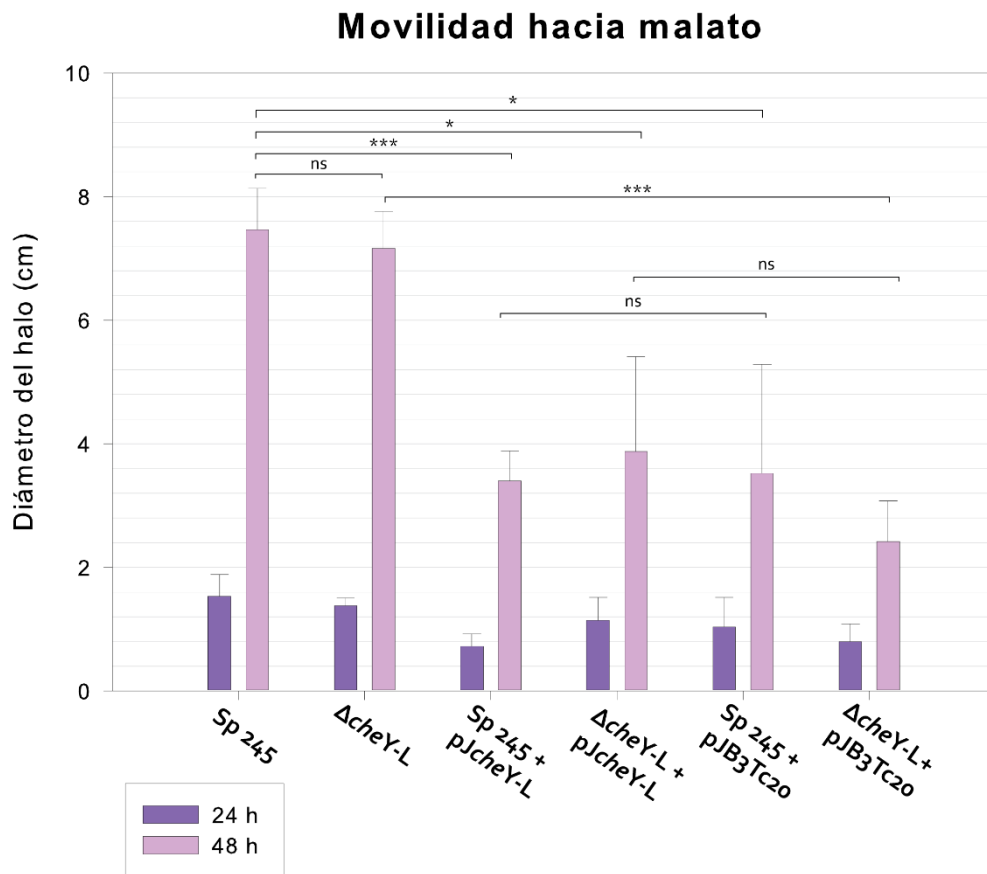


Figura 19. Movilidad con malato como quimioattractante. Cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes. Se muestra también la desviación estándar con líneas en medio de cada barra y la significancia estadística $*=P < 0.05$, $**=P < 0.01$, $***=P < 0.001$, $ns=$ no significativo.

Por otra parte, se observó una diferencia significativa entre la cepa silvestre y la cepa sobreexpresada (*A. baldaniorum* pJ*cheY*), así como entre la mutante $\Delta cheY-L$ y el control ($\Delta cheY-L$ pJB3Tc20). Así mismo, se

encontraron diferencias significativas entre la cepa silvestre, su control y entre la cepa silvestre y la cepa complementada ($\Delta cheY-L$ pJcheY).

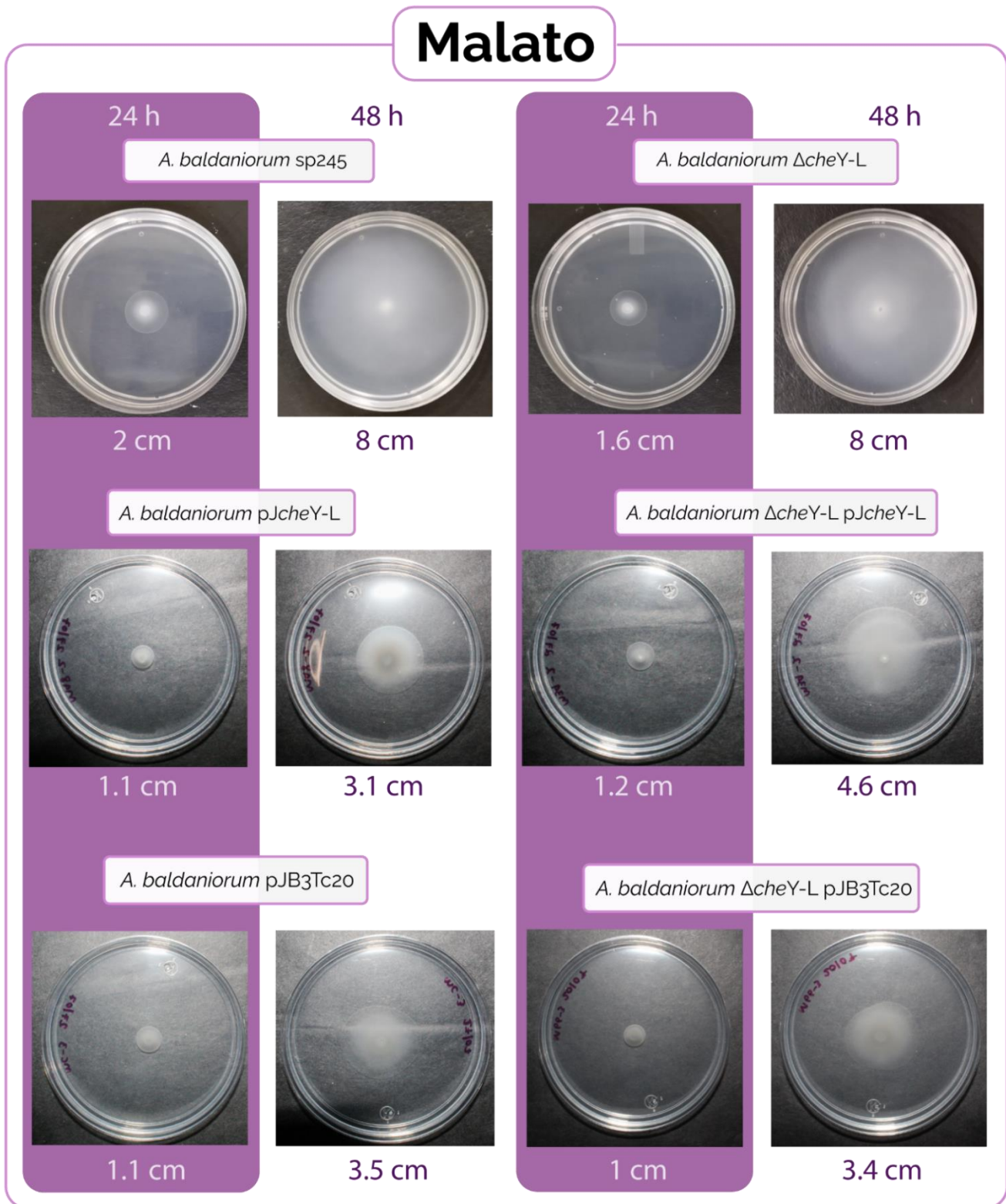


Figura 20. Movilidad en placa suave con malato como quimioattractante. Se muestra únicamente una réplica de un ensayo de los tres realizados en total, con su respectiva medida individual.

8.9.2 Movilidad hacia lactato.

La **Figura 22** muestra la gráfica de los ensayos de movilidad hacia lactato, donde no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre la mayoría de las cepas. A las 24 h se observa una pequeña diferencia de la movilidad en la cepa silvestre, sin embargo, a las 48h este es similar al de la cepa mutante de *cheY*-L. La única diferencia estadísticamente significativa observada es entre la cepa silvestre y la cepa complementada ($\Delta cheY$ -L p*JcheY*). En la **Figura 23** se muestran fotografías del ensayo.

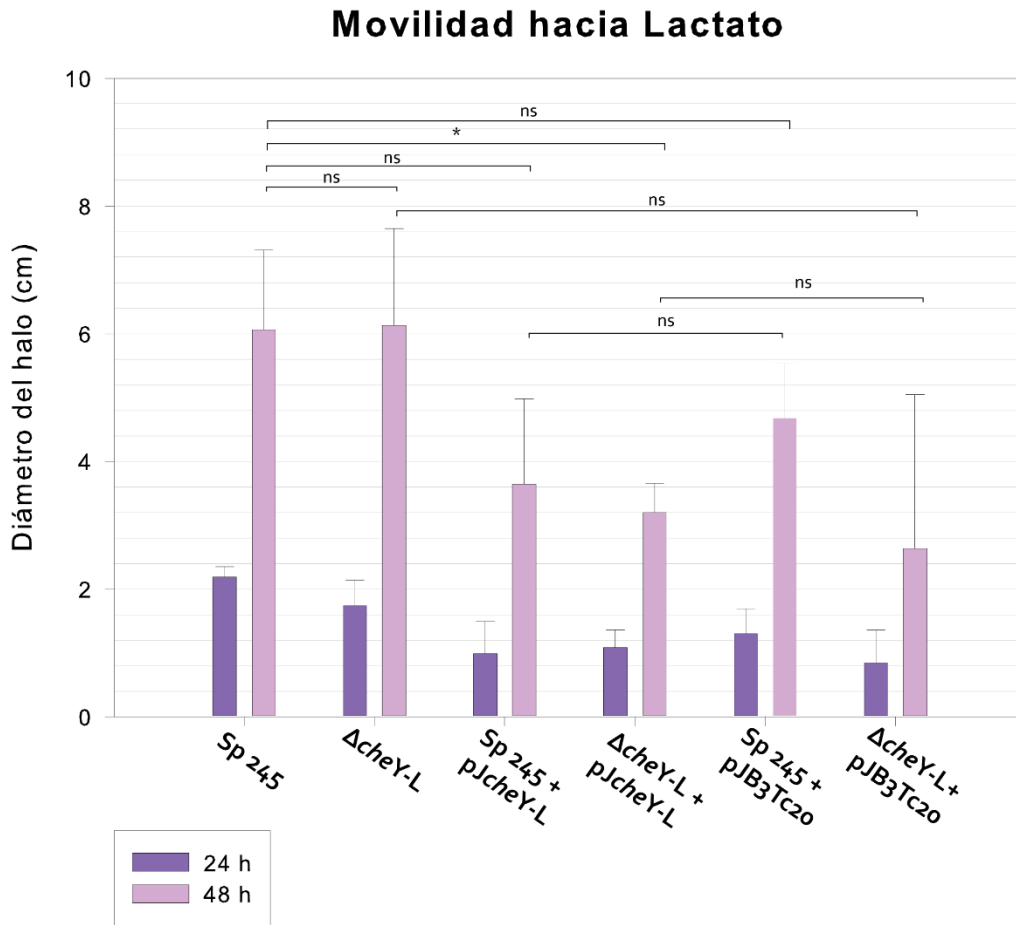


Figura 21. Movilidad con lactato como quimioattractante. Cada barra representa el promedio de tres ensayos independientes. Se muestra también la desviación estándar con líneas en medio de cada barra y la significancia estadística $*=P < 0.05$, $**=P < 0.01$, $***=P < 0.001$, ns= no significativo.

Lactato

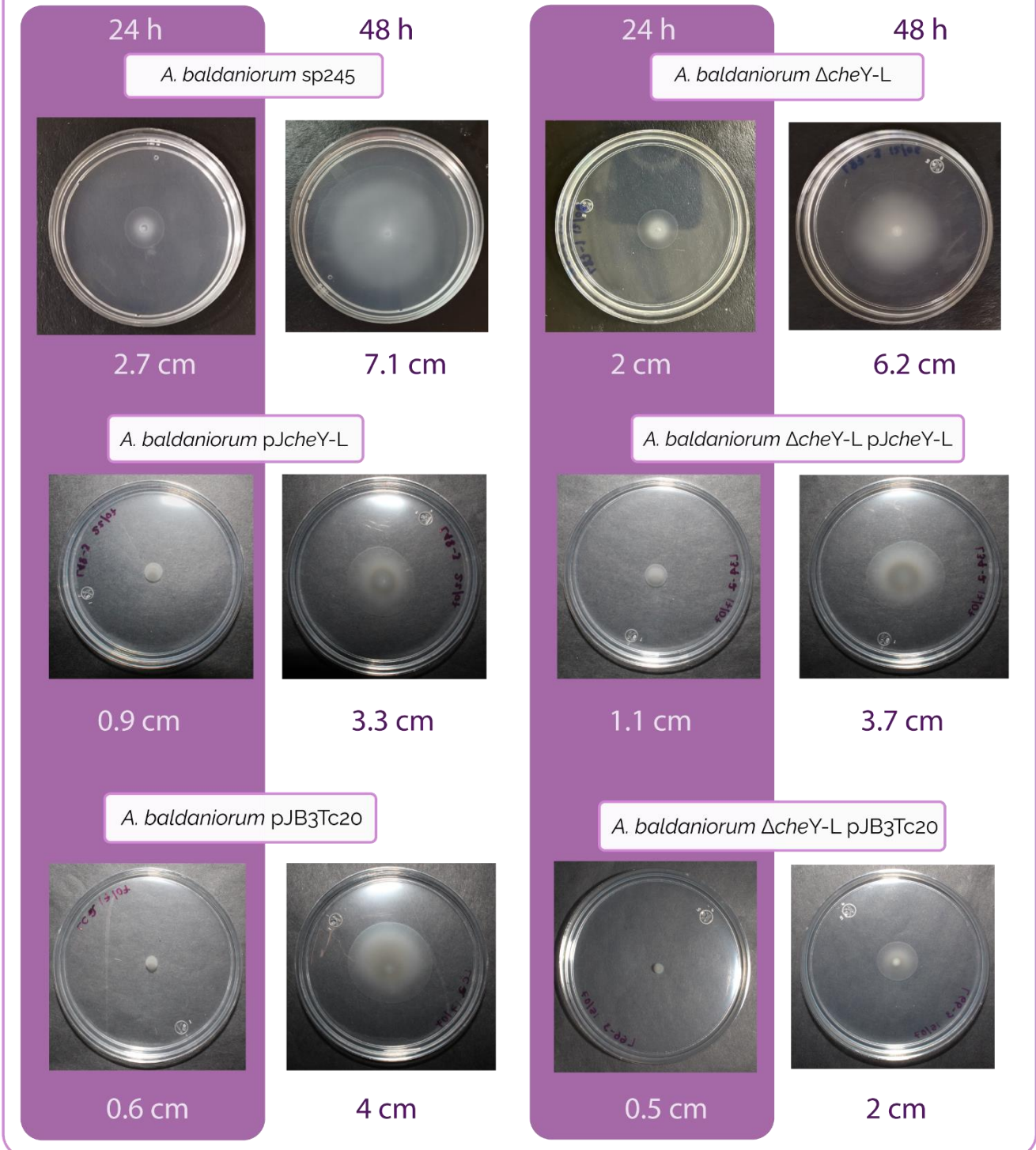


Figura 22. Movilidad en placa suave con lactato como quimioattractante. Se muestra únicamente una réplica de un ensayo de los tres realizados en total, con su respectiva medida individual.

8.9.3 Movilidad hacia prolina

En cuanto a la movilidad hacia prolina, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento de las cepas a las 48 h. No obstante, se realizó un análisis estadístico del crecimiento a las 24 h, entre la mutante (*cheY-L*) y la cepa silvestre y se encontró diferencia significativa en la movilidad (Figura 24).

Cabe destacar un aspecto notable en este ensayo, que es la apariencia translúcida y poco perceptible de algunos halos de movilidad. Esto se aprecia claramente en la fotografía de las 48 h de la cepa 245 p*JcheY-L* en la Figura 25, donde se observa un halo muy marcado en el centro que se atenúa a medida que se acerca al borde, lo que da la impresión de la presencia de dos halos superpuestos. Este fenómeno no se observó con los otros quimioattractantes.

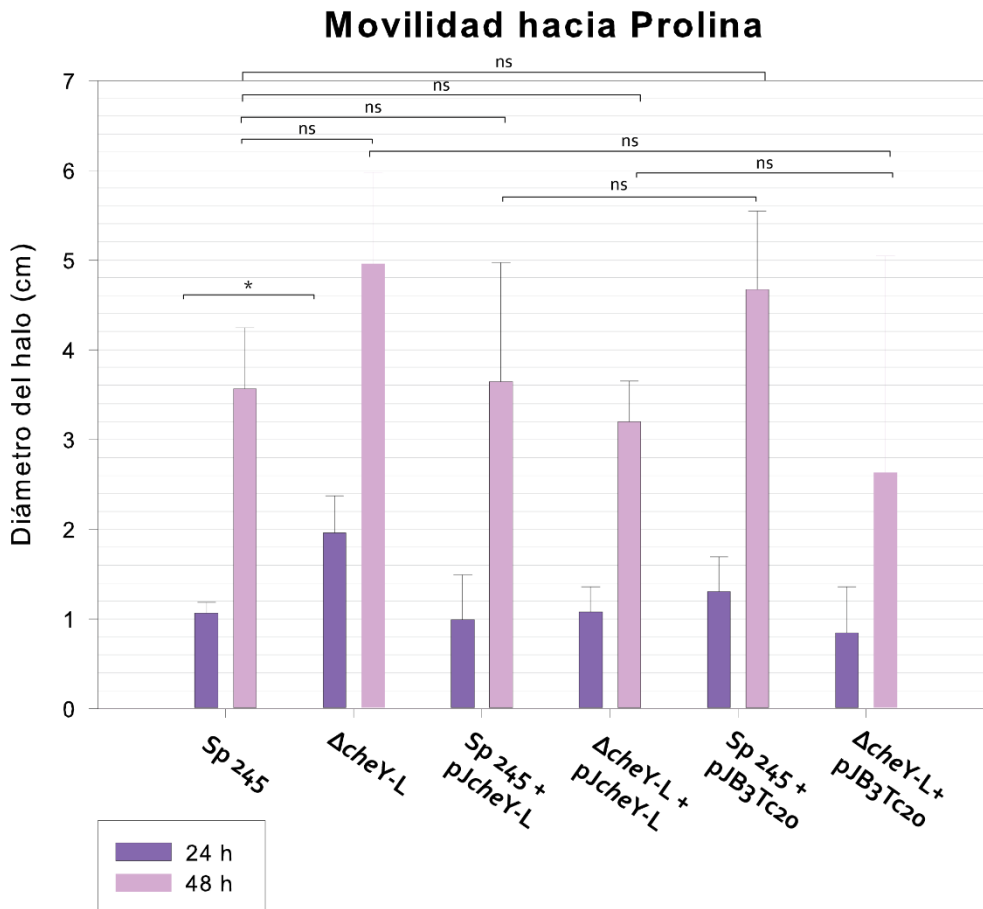


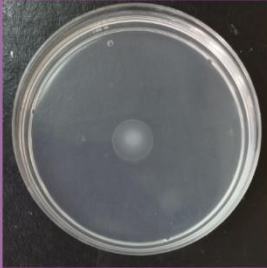
Figura 23. Movilidad en placa suave con prolina como quimioattractante. Se muestra únicamente una réplica de un ensayo de los tres realizados en total, con su respectiva medida individual y la significancia estadística $*=P < 0.05$, $**=P < 0.01$, $***=P < 0.001$, ns= no significativo.

Prolina

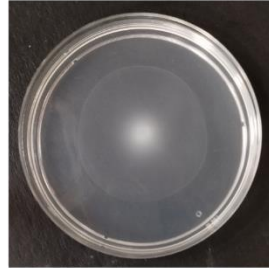
24 h

48 h

A. baldaniorum sp245



1.5 cm

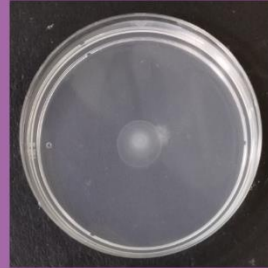


5.2 cm

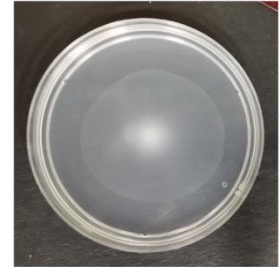
24 h

48 h

A. baldaniorum Δ cheY-L



1.7 cm

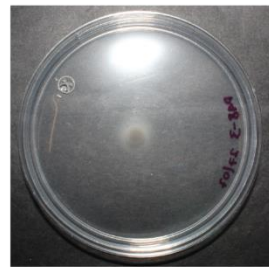


5.2 cm

A. baldaniorum pJcheY-L



0.9 cm

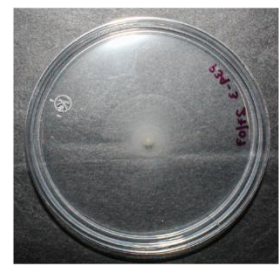


3.9 cm

A. baldaniorum Δ cheY-L pJcheY-L



0.5 cm

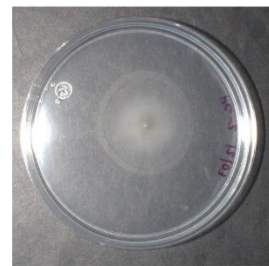


3.5 cm

A. baldaniorum pJB3Tc20

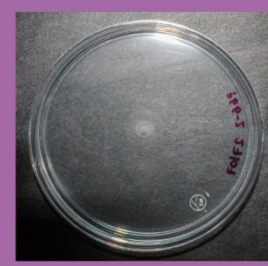


1 cm

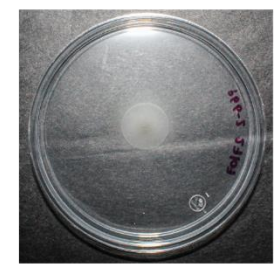


4.1 cm

A. baldaniorum Δ cheY-L pJB3Tc20



1 cm



3.4 cm

Figura 24. Movilidad en placa suave con prolina como quimioattractante. Se muestra únicamente una réplica de un ensayo de los tres realizados en total, con su respectiva medida individual.

9. DISCUSIÓN

La **Figura 18** muestra el gráfico con las curvas de crecimiento de las cepas incluidas en el presente proyecto. Se observa un crecimiento disminuido en las mutantes que contienen el plásmido pJB3Tc20 o pJcheY. Los plásmidos adquiridos representan un costo energético que la bacteria hospedera debe asumir, eso puede verse ligeramente reflejado en la replicación del nuevo material genético ya que los plásmidos codifican para sus propias proteínas Rep que reclutan a su vez maquinaria de replicación de ADN, como ADN polimerasas, helicasas y topoisomerasas del hospedero bacteriano (San Millan & MacLean, 2017).

El costo energético en la aptitud metabólica de los plásmidos es más notorio en la traducción de los genes y está determinado por la discrepancia entre la abundancia de mRNA plasmídicos y la disponibilidad de tRNAs, así como aminoácidos y ribosomas. Además, la producción de las proteínas incluidas en este material genético puede tener interacciones no deseadas en las redes de interacción proteicas preexistentes en la célula (San Millan & MacLean, 2017). A pesar de que el gen *cheY* tiene un tamaño relativamente pequeño (un fragmento ligado de 555 pb), el plásmido total tiene un tamaño de 7596 pb y *Azospirillum baldaniorum* Sp245, como hospedera, debe codificar el contenido de las proteínas contenidas en el plásmido. Por ejemplo, los operones *parDE* y *parCBA* son importantes para el mantenimiento del plásmido dentro de las células (Blatny et al., 1997). Estos operones desempeñan papeles cruciales en la estabilidad del plásmido: *parDE* codifica para un sistema toxina-antitoxina, mientras que *parCBA* es un sistema de resolvasas (Johnson et al., 1996). Otras proteínas significativas incluidas en el plásmido son la proteína iniciadora de replicación TrfA y los reguladores positivos *xyk* y *xyls*. Es importante tener en cuenta que todo este costo energético implicado en el metabolismo de *A. baldaniorum* Sp245 se multiplica por el número de copias de pJB3Tc20, con un rango de 5-7 por célula (Blatny et al., 1997). Estos factores pudieron haber interferido en el óptimo crecimiento de las cepas que contenían el plásmido pJB3Tc20 o pJcheY-L, siendo las dos cepas con menos crecimiento *A. baldaniorum* Δ cheY-L pJB3Tc20 y *A. baldaniorum* Δ cheY-L pJcheY-L.

La producción de biopelícula no mostró diferencias estadísticamente significativas entre la mutante y la cepa silvestre, así como entre la mutante complementada pJcheY y la mutante con el control pJB3Tc20. En *A. brasilense* Sp7, se ha investigado la formación de biopelícula, observándose una menor producción en las cepas Δ cheY6 y Δ cheY4 en comparación con la cepa silvestre (Ganusova et al., 2021).

En *E. coli*, las redes de señalización de movilidad están involucradas en su unión a superficies. La inhibición de la vía quimiotáctica mejora la adhesión a superficies al suprimir las reorientaciones del movimiento de las células. Las cepas mutantes Δ cheY y Δ cheA mostraron una mejor unión inicial a superficies en comparación con las cepas mutantes Δ fliC, Δ motA y Δ cheZ, las cuales están desprovistas de una de las proteínas estructurales del flagelo, la proteína integral de membrana que forma parte del estator del rotor flagelar y la fosfatasa de CheY, respectivamente (Suchanek et al., 2020). El nado suave de Δ cheY y Δ cheA podría estar atrapando a las células en la proximidad de la superficie, ya que pasan periodos prolongados en este sitio, además de la falta de cambios en el nado, acción que les permite resistirse a las fuerzas hidrodinámicas que las acercan a las superficies. La unión a superficies en *E. coli* es promovida por la estimulación de los quimioatrayentes, que disminuyen la actividad de la vía quimiotáctica. Por lo tanto, la quimiotaxis podría controlar la unión a superficies que secretan quimioefectores (Suchanek et al., 2020).

Por otro lado, en *Agrobacterium tumefaciens*, la proteína CheY-like llamada ClaR actúa como un regulador negativo en la formación de biopelículas. La mutante *A. tumefaciens* Δ claR no muestra un déficit en la movilidad, pero presenta un claro aumento en la formación de biopelícula en comparación con la cepa silvestre. Este efecto se manifiesta sin un aumento en los niveles de di-GMP-c. El análisis bioinformático de ClaR revela que los dominios que la componen, REC₁ y REC₂, poseen 4 hélices en lugar de las 5 hélices canónicas encontradas en otras CheY, siendo este el sitio encargado de interactuar con el switch flagelar en *E. coli* (Feirer et al., 2017).

En *Shewanella oneidensis*, CheY es el principal regulador de la quimiotaxis. Cuando está fosforilado, actúa en el motor flagelar para cambiar o detener su rotación de acuerdo con los estímulos recibidos. Además de este papel, CheY₃-P también tiene influencia en la formación de biopelículas asociadas a superficies y en películas. Para que esto se lleve a cabo, CheY₃ no es necesariamente fosforilada por su CheA₃ cognado, sin embargo, la fosforilación por parte de esta histidina quinasa, determina la maduración y parte del grosor de la biopelícula. Se propone también que CheY₃ podría unirse a diguanilato ciclasas o efectores de di-GMP-c para ser liberados en su efector blanco, por lo que en *S. oneidensis* se tiene una CheY con actividad dual (Boyeldieu et al., 2020).

Como se evidencia en las figuras 22, 23 y 24, no se observa una diferencia significativa en la movilidad entre la cepa mutante Δ cheY-L y la cepa silvestre en presencia de ninguno de los quimioattractantes. Esta falta de diferencia podría ser atribuida a la posible compensación de la mutación por otras proteínas CheY presentes. Cardona, en su estudio del 2021, informó que en *A. baldaniorum* Sp245 se identifican diversas proteínas CheY en operones de quimiotaxis y señalización, y que, además, los dos operones canónicos para quimiotaxis están presentes en *A. brasilense* Sp7, e igualmente presentes en *A. baldaniorum* Sp245 (Cardona Baltazar, 2021). Por lo tanto, la eliminación de cheY-L podría no tener una implicación significativa en la movilidad natatoria.

Las CheY canónicas de *A. brasilense* Sp7 desempeñan roles distintos en la movilidad. Por ejemplo, CheY₁ influye en la velocidad de nado, mientras que CheY₄ y CheY₆ tienen efectos en las reversiones del flagelo. Esta diversidad en las actividades de las distintas CheY complementa la movilidad en conjunto. Por lo tanto, cuando se muta alguna de ellas, la facultad de movilidad no se pierde por completo, sino que se ve parcialmente afectada (Ganusova et al., 2021).

Los resultados del presente estudio contrastan con los de (Ganusova et al., 2021), donde se observa que CheY₇, a pesar de estar fuera de los operones principales de quimiotaxis, desempeña un papel importante en la movilidad en agar suave. La mutante Δ cheY₇ muestra una menor movilidad en concentraciones de agar del 0.2% al 0.7%, a comparación de las otras mutantes sin cheY, además de carecer de quimiotaxis. Por otro lado, cheY-L de *A. baldaniorum* Sp245 también se encuentra fuera de los operones principales de quimiotaxis, pero en este estudio no se observó un efecto en la movilidad natatoria atribuida al flagelo polar, de la mutante Δ cheY en las condiciones evaluadas.

El malato, como ácido orgánico intermediario del ciclo de Krebs, representa una fuente de carbono ampliamente utilizada por *A. baldaniorum* Sp245 y es también un quimioattractante efectivo. En los ensayos de movilidad hacia malato, no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la cepa silvestre y la cepa mutante Δ cheY-L (Figura 20). Sin embargo, se observó una marcada diferencia entre la cepa silvestre y la cepa sobreexpresada. En este caso, no se puede atribuir exclusivamente al gen cheY insertado en el plásmido, ya que las cepas control que solo contenían el plásmido pJB3Tc20 también

mostraron una movilidad disminuida. Incluso cuando se comparan estadísticamente las cepas control con las cepas que contienen el gen *cheY* insertado, no se encontró una diferencia significativa en su movilidad. Esto sugiere que el plásmido está ejerciendo un efecto en el desempeño del metabolismo de la bacteria y por ende de la movilidad en las cepas que lo contienen (San Millan & MacLean, 2017).

El plásmido de amplio rango de hospedero Paro60302 se ve involucrado en cambios metabólicos relacionados con el metabolismo del carbono de *E. coli* DH10. Este vector reguló negativamente el operón *citDEFXG*, que convierte el malato en acetato y oxalacetato, lo que evidencia que ciertos plásmidos pueden alterar las vías metabólicas de sus hospederos (Lang & Johnson, 2015).

El lactato es un ácido carboxílico que puede ser convertido a piruvato por medio de la enzima lactato deshidrogenasa (Kanehisa Laboratories, 2023), lo que lo convierte en un metabolito importante como fuente de carbono para *Azospirillum baldaniorum* Sp245 y un quimioattractante que estimula su movilidad. En los ensayos realizados no se encontraron diferencias significativas entre la cepa mutante $\Delta cheY$ y la cepa silvestre. También se observa un fenómeno similar al de la movilidad con malato, donde las cepas con plásmido pJB3Tc20 o pJcheY muestran menor movilidad que la cepa mutante y entre ellas no se detecta una diferencia estadísticamente significativa. La única disparidad estadística se observa entre la cepa silvestre y la cepa complementada ($\Delta cheY$ pJcheY) (Figura 22). Esto puede deberse al efecto del plásmido en el metabolismo, como se discutió anteriormente.

La prolina se considera un quimioatrayente moderado y un sustrato de crecimiento relativamente pobre en *A. brasilense* Sp7 (Alexandre et al., 2000). En los ensayos de nado realizados con este quimioatrayente en *A. baldaniorum* Sp245, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la cepa mutante $\Delta cheY$ -L y la cepa silvestre, tampoco sus controles ni la cepa complementada ($\Delta cheY$ pJcheY) ni sobreexpresada (Sp245 pJcheY) revelaron discrepancias (Figura 24). Existe una diferencia estadísticamente significativa en la movilidad de la cepa silvestre y la cepa mutante $\Delta cheY$ a las 24 h de incubación, sin embargo, este evento no se replica entre el control de $\Delta cheY$ -L ($\Delta cheY$ -L pJB3Tc20) y el control de la cepa silvestre (Sp245 pJB3Tc20), o entre el control de $\Delta cheY$ -L y la cepa complementada ($\Delta cheY$ -L pJcheY-L), por lo que de acuerdo a estos resultados, se descartaría un papel antagonista de *cheY*-L en el metabolismo dentro de las primeras 24 horas de crecimiento con prolina como fuente de carbono en *A. baldaniorum* Sp245.

En algunos casos, la adquisición de plásmidos se ha asociado con la reducción de la movilidad bacteriana (Billane et al., 2022). Por ejemplo, en diferentes especies de *Pseudomonas*, se observó que el plásmido pCAR1 condujo a una disminución en la movilidad en agar suave. Eso podría explicarse por una posible interferencia en el ensamblaje del flagelo o una limitación en la energía disponible para el motor flagelar. No obstante, no se observaron cambios en los fenotipos de nado y *twitching* entre las cepas con y sin el plásmido (Takahashi et al., 2015).

10. CONCLUSIONES

- Bajo las condiciones establecidas, no se observa una diferencia estadísticamente significativa en la producción de biopelícula entre la mutante $\Delta cheY$ y la cepa silvestre. Tampoco entre la cepa silvestre y la mutante complementada ($\Delta cheY$ pJcheY), ni la sobreexpresada (245 pJcheY), así como en la comparación con sus cepas control.
- No existe diferencia estadísticamente significativa entre la movilidad de la mutante $\Delta cheY$ y la cepa silvestre en presencia de los quimioattractantes malato, lactato y prolina. Esto sugiere que *cheY-L* no desempeña un papel imprescindible en la movilidad bajo las condiciones evaluadas.
- El plásmido pJB3Tc20 podría estar imponiendo una carga en el metabolismo de *A. baldaniorum*, Sp 245 lo que posiblemente tenga un efecto adverso en el crecimiento y desarrollo normal de la bacteria.

11. PERSPECTIVAS

- En *A. brasilense* Sp7, una especie filogenéticamente cercana a *A. baldaniorum* Sp245, la aerotaxis está regulada por las mismas vías que la quimiotaxis (Ganusova et al., 2021), por lo que sería otra opción de fenotipo a evaluar para descartar la participación de *cheY-L* en otros tipos de quimiotaxis.
- Debido a las desventajas observadas con el plásmido pJB3Tc20 sería importante utilizar técnicas de complementación en cis.
- Debido a que las condiciones establecidas en este proyecto no revelaron evidencia de un papel de *cheY-L* en la quimiotaxis, podría cambiarse las fuentes de carbono por otras que también utilice *A. baldaniorum* Sp245, por ejemplo, fructosa o gluconato.
- Los genes involucrados en quimiotaxis tienen papeles importantes en la supervivencia de especies bacterianas en condiciones adversas de pH, temperatura y salinidad (Xu et al., 2021),(Fan et al., 2020) por lo que resultaría útil evaluar el desempeño de *cheY-L* en condiciones de estrés.
- La realización de dobles mutantes podría revelar fenotipos influenciados por *cheY-L*
- Es importante el estudio de la activación de *cheY-L*, esto podría realizarse mediante etiquetas fluorescentes que permitan reportar la fosforilación (Stewart & VanBruggen, 2004).

12. BIBLIOGRAFÍA

- Alexandre, G., Greer, S. E., & Zhulin, I. B. (2000). Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense*. *Journal of bacteriology*, 182(21), 6042–6048. <https://doi.org/10.1128/jb.182.21.6042-6048.2000>
- Avalos Rangel, M. Á. (2016). *Participación de la diguanilato ciclasa E de Azospirillum brasilense Sp245 en crecimiento y estrés*. Benemerita Universidad Autónoma de Puebla.
- Billane, K., Harrison, E., Cameron, D., & Brockhurst, M. A. (2022). Why do plasmids manipulate the expression of bacterial phenotypes? *Philosophical Transactions of the Royal Society. Series B: Biological Sciences*, 377(1842), 1–8. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0461>
- Blatny, J. M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H. C., Haugan, K., & Valla, S. (1997). Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 370–379. <https://doi.org/10.1128/aem.63.2.370-379.1997>
- Boyardieu, A., Ali Chaouche, A., Ba, M., Honoré, F. A., Méjean, V., & Jurlin-Castelli, C. (2020). The phosphorylated regulator of chemotaxis is crucial throughout biofilm biogenesis in *Shewanella oneidensis*. *npj Biofilms and Microbiomes*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00165-5>
- Cardona Baltazar, U. (2021). *Análisis del gen cheY de Azospirillum baldaniorum Sp245*. Benemerita Universidad Autónoma de Puebla.
- Casino, P., Rubio, V., & Marina, A. (2010). The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(6), 763–771. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.09.010>
- Cheng, H. R., & Jiang, N. (2006). Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology Letters*, 28(1), 55–59. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-4688-z>
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>
- Cordero Rivera, C. D. (2017). *Obtención de la mutación del gen hskB de Azospirillum brasilense y análisis de su fenotipo*. Benemerita Universidad Autónoma de Puebla.
- Cruz-Pérez, J. F., Lara-Oueilhe, R., Marcos-Jiménez, C., Cuatlayotl-Olarte, R., Xiqui-Vázquez, M. L., Reyes-Carmona, S. R., Baca, B. E., & Ramírez-Mata, A. (2021). Expression and function of the cdgD gene, encoding a CHASE–PAS–DGC–EAL domain protein, in *Azospirillum brasilense*. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80125-3>
- de Souza, R., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 401–419. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>

- Fan, Y., Qiao, J., Lu, Z., Fen, Z., Tao, Y., Lv, F., Zhao, H., Zhang, C., & Bie, X. (2020). Influence of different factors on biofilm formation of *Listeria monocytogenes* and the regulation of cheY gene. *Food Research International*, 137. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109405>
- Feirer, N., Kim, D., Xu, J., Fernandez, N., Waters, C. M., & Fuqua, C. (2017). The agrobacterium tumefaciens cheY-like protein clR regulates biofilm formation. *Microbiology (United Kingdom)*, 163(11), 1680–1691. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000558>
- Ferreira, N. D. S., Sant' Anna, F. H., Reis, V. M., Ambrosini, A., Volpiano, C. G., Rothballe, M., Schwab, S., Baura, V. A., Balsanelli, E., Pedrosa, F. de O., Passaglia, L. M. P., de Souza, E. M., Hartmann, A., Cassan, F., & Zilli, J. E. (2020). Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* SP245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(12), 6203–6212. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004517>
- Ganusova, E. E., Vo, L. T., Mukherjee, T., & Alexandre, G. (2021). Multiple CheY proteins control surface-associated lifestyles of *Azospirillum brasilense*. *Frontiers in Microbiology*, 12(5), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664826>
- Dario Cassán, F., Okon, Y., & Creus M., C. (2015). Handbook for *Azospirillum*. En F. D. Cassán, Y. Okon, & C. M. Creus (Eds.), *PLoS one* (Vol. 12, Número 3). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7>
- Johnson, E. P., Strom, A. R., & Helinski, D. R. (1996). Plasmid RK2 toxin protein ParE: purification and interaction with the ParD antitoxin protein. *Journal of bacteriology*, 178(5), 1420–1429. <https://journals.asm.org/journal/jb>
- Kanehisa Laboratories. (2023, septiembre 8). *Pyruvate metabolism - Azospirillum baldaniorum Sp245*. <https://www.genome.jp/pathway/abs00620>
- Lang, K. S., & Johnson, T. J. (2015). Transcriptome modulations due to A/C2 plasmid acquisition. *Plasmid*, 80, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.05.005>
- Mancilla Simbro, C., Reyes Carmona, S. R., & Ramírez Mata, A. (2021). *Análisis de secuencias de DNA y proteínas por métodos bioinformáticos*.
- Mukherjee, T., Kumar, D., Burriss, N., Xie, Z., & Alexandre, G. (2016). *Azospirillum brasilense* chemotaxis depends on two signaling pathways regulating distinct motility parameters. *Journal of Bacteriology*, 198(12), 1764–1772. <https://doi.org/10.1128/JB.00020-16>
- Nesper, J., Hug, I., Kato, S., Hee, C. S., Habazettl, J. M., Manfredi, P., Grzesiek, S., Schirmer, T., Emonet, T., & Jenal, U. (2017). Cyclic di-GMP differentially tunes a bacterial flagellar motor through a novel class of cheY-like regulators. *eLife*, 6, 1–25. <https://doi.org/10.7554/eLife.28842>
- Pedraza, R. O., Filippone, M. P., Fontana, C., Salazar, S. M., Ramírez-Mata, A., Sierra-Cacho, D., & Baca, B. E. (2020). *Azospirillum*. En *Beneficial microbes in agro-ecology* (Número January, pp. 73–105). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823414-3.00006-x>
- Raffi, M. M., & Charyulu, P. B. B. N. (2020). *Azospirillum*-biofertilizer for sustainable cereal crop production: current status. En *Recent developments in applied microbiology and biochemistry: Volume 2* (pp. 193–209). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821406-0.00018-7>

- Ramírez-Mata, A., Fernández-Domínguez, I. J., Nuñez-Reza, K. J., & Xiqui-Vázquez Beatriz E Baca, M. L. (2014). Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias: quorum sensing, di-GMPc y óxido nítrico. *Revista argentina de microbiología*, 46(3), 242–255. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70079-3](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70079-3)
- Rodrigues, A. C., Bonifacio, A., de Araujo, F. F., Junior, M. A. L., & do Vale Barreto Figueiredo, M. (2015). Azospirillum sp. as a challenge for Agriculture. En *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem* (Vol. 12, pp. 29–51). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24654-3_2
- Sambrook, J., & Green, M. R. (2012). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual on the web*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- San Millan, A., & MacLean, R. C. (2017). Fitness Costs of Plasmids: a Limit to Plasmid Transmission. *Microbiology Spectrum*, 5(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mtbp-0016-2017>
- Sánchez Gonzáles, J. de J. (2023). *Complementación de la mutante $\Delta hkhB$ de Azospirillum baldaniorum Sp245*. Benemerita Universidad Autónoma de Puebla.
- Sierra Cacho, D., Zamorano Sánchez, D. S., Xiqui-Vázquez, M. L., Viruega Góngora, V. I., Ramírez-Mata, A., & Baca, B. E. (2021). CdgC, a Cyclic-di-GMP diguanylate cyclase of Azospirillum baldaniorum is involved in internalization to wheat roots. *Frontiers in plant science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.748393>
- Srivastav, A. L. (2020). Chemical fertilizers and pesticides: role in groundwater contamination. En *Agrochemicals detection, treatment and remediation: pesticides and chemical fertilizers* (pp. 143–159). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-103017-2.00006-4>
- Stewart, R. C., & VanBruggen, R. (2004). Phosphorylation and binding interactions of CheY studied by use of Badan-labeled protein. *Biochemistry*, 43(27), 8766–8777. <https://doi.org/10.1021/bio495735>
- Suchanek, V. M., Esteban-López, M., Colin, R., Besharova, O., Fritz, K., & Sourjik, V. (2020). Chemotaxis and cyclic-di-GMP signalling control surface attachment of Escherichia coli. *Molecular Microbiology*, 113(4), 728–739. <https://doi.org/10.1111/mmi.14438>
- Takahashi, Y., Shintani, M., Takase, N., Kazo, Y., Kawamura, F., Hara, H., Nishida, H., Okada, K., Yamane, H., & Nojiri, H. (2015). Modulation of primary cell function of host Pseudomonas bacteria by the conjugative plasmid pCAR1. *Environmental Microbiology*, 17(1), 134–155. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12515>
- Xu, X., Li, H., Qi, X., Chen, Y., Qin, Y., Zheng, J., & Jiang, X. (2021). cheA, cheB, cheR, cheV, and cheY are involved in regulating the adhesion of Vibrio harveyi. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.591751>

13. ANEXOS

13.1 MEDIOS DE CULTIVO

ROJO CONGO	
Para 1L	
Acido málico	5 g
Ext. de levadura	0.5 g
K₂HPO₄	0.5 g
NaCl	0.1 g
FeCl₃	1.4 g
Na₂MoO₄	0.002 g
KOH	4.8 g
Rojo Congo	15 ml
AGAR	15 g

Ajustar a pH 6.8 antes de añadir el rojo Congo. Esterilizar a 15 lb por 20 minutos.

K MALATO	
Para 1L	
KH₂PO₄	0.87 g
K₂HPO₄	1.67g
MgSO₄. 7H₂O	0.29 g
NaCl	0.48 g
Acido málico	4.53 g

Ajustar a pH 6.9 y esterilizar a 15 lb por 30 minutos. Después añadir las siguientes soluciones:

Para 1L	
CaCl₂ 0.7%	10 ml
NH₄Cl 20%	5 ml
FeCl₃ 1%	1 ml
Na₂MoO₄ 0.5%	1 ml
Oligoelementos	1 ml

MD	
Para 1L	
Medio difco	8 g
KCl	0.25 g
MnCl₂ 4H₂O	1 g
MgSO₄ 7H₂O	0.01 g
Agar bacteriológico	15 g

Ajustar a pH 7.0 con NaOH y esterilizar a 15 lb por 30 minutos.

K LACTATO	
Para 1L	
KH₂PO₄	0.87 g
K₂HPO₄	1.67g
MgSO₄. 7H₂O	0.29 g
NaCl	0.48 g
Lactato de sodio	
60%	6.3 ml

Ajustar a pH 6.9 y esterilizar a 15 lb por 30 minutos. Después añadir las siguientes soluciones:

Para 1L	
CaCl₂ 0.7%	10 ml
NH₄Cl 20%	5 ml
FeCl₃ 1%	1 ml
Na₂MoO₄ 0.5%	1 ml
Oligoelementos	1 ml

NFB	
Para 1L	
Ac. málico	3.7 g
K₂HPO₄ al 10%	5 ml
MgSO₄. 7H₂O al 10%	2 ml
NaCl al 10%	1 ml
CaCl₂H₂O al 1%	2 ml
Sol.	
Micronutrientes	2 ml
Fe.EDTA	4 ml
Fuente de nitrógeno	
KNO₃	1.39 g
CINH₄	0.73 g

Ajustar a pH 6.5 con KOH y esterilizar a 15 lb por 30 minutos.

LB	
Para 1L	
Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar bacteriológico	15 g

Ajustar a pH 7.0 con NaOH y esterilizar a 15 lb por 30 minutos.

<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">LB * 10 mM NaCl</th> </tr> <tr> <th colspan="2">Para 1L</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Peptona de caseína</td> <td>10 g</td> </tr> <tr> <td>Extracto de levadura</td> <td>5 g</td> </tr> <tr> <td>NaCl al 10%</td> <td>5.8 ml</td> </tr> <tr> <td>CaCl₂ 10%</td> <td>3.7 ml</td> </tr> <tr> <td>MgSO₄ 10%</td> <td>6 ml</td> </tr> </tbody> </table>	LB * 10 mM NaCl		Para 1L		Peptona de caseína	10 g	Extracto de levadura	5 g	NaCl al 10%	5.8 ml	CaCl₂ 10%	3.7 ml	MgSO₄ 10%	6 ml	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">LB *</th> </tr> <tr> <th colspan="2">Para 1L</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Peptona de caseína</td> <td>10 g</td> </tr> <tr> <td>Extracto de levadura</td> <td>5 g</td> </tr> <tr> <td>NaCl</td> <td>5 g</td> </tr> <tr> <td>CaCl₂ 2H₂O</td> <td>0.36 g</td> </tr> <tr> <td>MgSO₄ 7H₂O</td> <td>0.61 g</td> </tr> <tr> <td>Agar bacteriológico</td> <td>15 g</td> </tr> </tbody> </table>	LB *		Para 1L		Peptona de caseína	10 g	Extracto de levadura	5 g	NaCl	5 g	CaCl₂ 2H₂O	0.36 g	MgSO₄ 7H₂O	0.61 g	Agar bacteriológico	15 g
LB * 10 mM NaCl																															
Para 1L																															
Peptona de caseína	10 g																														
Extracto de levadura	5 g																														
NaCl al 10%	5.8 ml																														
CaCl₂ 10%	3.7 ml																														
MgSO₄ 10%	6 ml																														
LB *																															
Para 1L																															
Peptona de caseína	10 g																														
Extracto de levadura	5 g																														
NaCl	5 g																														
CaCl₂ 2H₂O	0.36 g																														
MgSO₄ 7H₂O	0.61 g																														
Agar bacteriológico	15 g																														
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;"> <p>Ajustar a pH 7.0 con NaOH y esterilizar a 15 lb por 30 minutos.</p> </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;"> <p>Ajustar a pH 7.0 con NaOH y esterilizar a 15 lb por 30 minutos.</p> </div>																														

13.2 TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE ADN ADAPTADA PARA *A. baldaniorum* Sp245.

1. Realizar un precultivo tomando de 1-3 colonias de un cultivo fresco o de Rojo Congo e incubar en 5 ml de K-malato a 30°C con agitación durante 18-24h, con el antibiótico correspondiente.
2. Inocular una dilución 1/100 en un matraz de 250 ml que contenga 100 ml de K-malato e incubar a 30°C 18-24h en agitación. La cantidad de cultivo se puede reducir a 20 ml de medio en matraces de 50 ml, dependiendo de la cantidad de ADN requerida. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante por decantación, reservar el paquete celular.
4. Lavar el paquete celular con 5ml de NaCl 3M y centrifugar 10,000 rpm por 10 min. Eliminar el sobrenadante y reservar el paquete celular.
5. Lavar el paquete celular con 5 ml de buffer de fosfatos pH = 6.8 - 7.5 y centrifugar 10, 000 rpm por 10 minutos. Realizar este paso 3 veces.
6. Resuspender en 2 ml de solución reguladora de lisis fría (solución 1 del protocolo de (Sambrook & Russell, 2001)). Agregar lisozima (4mg/ml). Incubar 5 min a temperatura ambiente.
7. Agregar 3 ml de la solución 2 (del protocolo de (Sambrook & Russell, 2001)), mezclar por inversión 3 veces. Incubar 5 min en hielo. Nota: La suspensión debe ser clara y viscosa.
8. Agregar 2 ml de solución 3 (del protocolo de (Sambrook & Russell, 2001)). y mezclar por inversión 3-6 veces. Colocar en hielo e incubar a - 20°C por 30 min. Centrifugar 20 min a 14,000 rpm a 4°C.
9. Transferir el sobrenadante a un tubo estéril y centrifugar 15 min 14,000rpm. Realizar dos veces este paso.

10. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y agregar 200 µl fenol, 200 µl de cloroformo - alcohol isoamílico y mezclar por inversión durante 5 min. Centrifugar 10'000 rpm durante 15 min. Repetir este paso 3 veces.
11. Hacer los lavados necesarios (5 aproximadamente) con cloroformo - alcohol isoamílico hasta que el sobrenadante luzca transparente. Después centrifugar a 10,000 rpm durante 8 minutos.
12. Colocar el sobrenadante en un tubo nuevo y añadir 0.7 volúmenes de isopropanol e incubar a temperatura ambiente durante 10 min. Si se desea dejar toda la noche, utilizar etanol 1:1 y dejar a - 20°C.
13. Centrifugar por 30 min a 14,000 rpm 4°C
14. Eliminar el sobrenadante por decantación, cuidando de no perder la pastilla
15. Lavar la pastilla con etanol al 70% frío, mezclar hasta que la pastilla se desprege del fondo. Centrifugar 8 min 10 000 rpm 4°C y decantar. Realizar este paso tres veces.
16. Poner los tubos abiertos sobre una servilleta o secar en el termoblock a 37 - 55°C.
17. Resuspender la pastilla en 40 µl de RNAsa e incubar a 37°C por 30 min.
18. Realizar una electroforesis con 7-10 µl del ADN.

13.3 PROTOCOLOS DE PCR

Amplificación de <i>cheY</i> -L de <i>A. baldaniorum</i> Sp 245		
Oligonucleótidos:	R <i>cheY</i> EcoRI y F <i>cheY</i> -BamHI	
Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
95	10:00	1
95	00:30	30
54	00:30	
72	00:30	
72	05:00	1
4	∞	1
Amplificación del gen de resistencia a tetraciclina del plásmido pJB3Tc20		
Oligonucleótidos:	FTetra y RTetra	
Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
95	05:00	1
95	00:40	30
55	00:40	
72	01:20	
72	05:00	1
4	∞	1
Amplificación del fragmento <i>cheY</i> -tetraciclina en pJ <i>cheY</i> -L		
Oligonucleótidos:	RpJB Y M13	
Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
95	05:00	1

95	0:30	30
52	0:30	
72	1:40	
72	05:00	1
4	∞	1